



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Medicina Veterinaria

Unidad de Posgrado

**Contribución al estudio histológico,
inmunohistoquímico y ultramicroscópico del islote
pancreático en fetos y a diferentes edades en alpacas
(Vicugna pacos)**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Ciencia Animal
con mención en Producción y Reproducción Animal

AUTOR

Francisco Javier SANTOS RUEDA

ASESOR

Alberto SATO SATO

Lima, Perú

2017



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Santos F. Contribución al estudio histológico, inmunohistoquímico y ultramicroscópico del islote pancreático en fetos y a diferentes edades en alpacas (*Vicugna pacos*). [Tesis de maestría]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina Veterinaria, Unidad de Posgrado; 2017.



1208

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
Facultad de Medicina Veterinaria
UNIDAD DE POSGRADO



1069
55

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE
MAGÍSTER EN CIENCIA ANIMAL CON MENCIÓN EN PRODUCCIÓN Y
REPRODUCCIÓN ANIMAL

En el Auditorio de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, siendo las 14:30 horas del día martes 11 de julio de 2017, el Jurado Examinador de Tesis de Grado de Magíster, presidido por el MSc. Alfonso Chavera Castillo y constituido por los siguientes miembros: MSc. Alberto Sato Sato (Asesor), Mg. Carlos Reynaldo Medina Sparrow, Dr. William Barrios Santos, Mg. Nieves Sandoval Chaupe, se dio inicio a la sustentación oral y pública de la Tesis intitulada:

"Contribución al estudio histológico, inmunohistoquímico y ultramicroscópico del islote pancreático en fetos y a diferentes edades en alpacas (Vicugna pacos)" presentado por el Médico Veterinario Zootecnista:

FRANCISCO JAVIER SANTOS RUEDA

Quien sustentó la Tesis para obtener el Grado Académico de Magíster en Ciencia Animal con mención en Producción y Reproducción Animal y absolvió satisfactoriamente las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado y practicada la votación obtuvo la calificación de: **MUY BUENO (17) DIECISIETE**

A continuación, el Presidente del Jurado recomendó a la Unidad de Posgrado de la Facultad de Medicina Veterinaria, proponga el otorgamiento del **Grado Académico de Magíster en Ciencia Animal con mención en Producción y Reproducción Animal**, al Médico Veterinario Zootecnista: **Francisco Javier Santos Rueda**.

Siendo las 16:00 horas del día martes 11 de julio de 2017, se dio por concluido el acto académico, suscribiéndose la presente Acta.

MSc. Alfonso Chavera Castillo (P.P.T.C.)
Presidente

Dr. William Barrios Santos (P. Aux. T.C.)
Miembro

Mg. Carlos Reynaldo Medina Sparrow
Miembro (Externo)

Mg. Nieves Sandoval Chaupe (P.P.D.E.)
Miembro

MSc. Alberto Sato Sato (P.P.D.E.)
Miembro (Asesor)

Dr. César Miguel Gavidia Chucán (P.P.D.E.)
Director de la Unidad de Posgrado
Facultad de Medicina Veterinaria
UNMSM

Dedicatorias

A mis amados padres, José Francisco y Eduviges, mis hermanos Paola Andrea y Oscar Manuel por su amor, enseñanzas y apoyo incondicional en todos los momentos de mi vida.

A mi amada esposa Nadia y adorado hijo Francisco Mael a quienes amo profundamente, son mi tranquilidad y motivo de constante inspiración en esta nueva etapa de vida.

A la familia Huanca López por su comprensión, apoyo y amor sin medida en esta nueva etapa que nos une como familia.

...A todos ellos mi eterno agradecimiento.

Agradecimientos

Al Dr. Alberto Sato Sato, por depositar su confianza y brindarme la oportunidad de profundizar en este bello mundo de la anatomía, por sus sabios consejos al dirigir esta tesis, por creer en mí y apoyarme en este constante crecimiento.

A la Dra. Miluska Navarrete Zamora (Milu), gran amiga y colega, mi más sincero agradecimiento por su amistad incondicional y perseverancia al instruirme en el arduo y enriquecedor trabajo de la docencia e investigación.

Al Dr. Alexander Chávez Reátegui (Alexiño), amigo y colega, por su gran humor, carisma y paciencia a la hora de sus enseñanzas, permitiendo un entorno ameno en cualquier lugar.

Al Dr. Marcelo Daniel Ghezzi Berruti, amigo y colega, por su amistad, cordial guía e invaluable consejos de vida.

A la Psic. Margarita Contreras por sus valores y principios, los cuales admiro.

A la familia Manchego Sandoval y familia Navarrete Zamora por ese brazo amigo incondicional ante las vicisitudes que da la vida.

A mis amigos Marco, Felipe, Milena y todas las personas que participaron en la realización de este sueño directa e indirectamente desde mi llegada a Perú.

A todo el personal docente, administrativo y alumnado de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos – Decana de América, por tan grata experiencia de vida.

Al convenio 097-2014-FONDECYT-DE por el financiamiento a la presente tesis de maestría.

PERÚ, gracias totales.

ÍNDICE

Resumen	vi
Abstract	vii
Lista de cuadros	viii
Lista de figuras	ix
Lista de Anexos	x
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2. Histología pancreática	4
2.1 Porción endocrina (islotes de Langerhans)	4
2.2 Componente celular y su función	6
2.2.1 Células alfa	6
2.2.2 Células beta	7
2.2.3 Células delta	7
2.2.4 Células PP	7
3. Morfogénesis	8
4. Descripción inmunohistoquímica	9
5. Microscopia electrónica	10
III. MATERIALES Y MÉTODOS	12
Lugar de ejecución y periodo de duración	12
Descripción del material experimental	12
Términos de ética	13
Toma y procesamiento de muestras	13
Histología pancreática endocrina	14
Técnica de inmunohistoquímica	14
Análisis de imágenes	16
Microscopia electrónica de barrido (SEM)	16
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	18
1. Descripción de las características microscópicas del páncreas endocrino	18
2. Determinación mediante inmunohistoquímica de las células productoras de insulina, glucagón, somatostatina y polipéptido pancreático	25
3. Descripción de la ultraestructura del páncreas endocrino de alpaca	41
	iv

VI. CONCLUSIONES	44
VIII. BIBLIOGRAFÍA	45
IX. ANEXOS	51

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue describir la arquitectura microscópica del desarrollo prenatal y postnatal del páncreas endocrino de la alpaca. La parte experimental se realizó en Cusco, en la estación experimental IVITA Maranganí, Perú. Se procesó las muestras en el área de Investigación Morfológica del LAAFS FMV-UNMSM. Se utilizaron 40 alpacas entre fetos de último tercio de gestación, crías, jóvenes y adultas, proveniente del descarte por defectos congénitos o destinados al camal. Se trabajaron cortes histológicos de 5 μ m de espesor con la coloración H-E y también técnicas de inmunohistoquímica (IHQ) empleando kits de IHQ, anticuerpos policlonales (anti-glucagón, anti-PP y anti-SSTR3) y anticuerpo monoclonal (anti-insulina) para identificar células endocrinas, siguiendo protocolo de inmunohistoquímica ABC. La lectura de las láminas se realizó con el microscopio binocular Leica DM750 con cámara digital incorporada y software de medición para cálculo de áreas. La intensidad de la marcación se clasificó cualitativamente. El control positivo fue páncreas de rata. Se evidenció islotes de Langerhans en todas las edades estudiadas a excepción de los fetos, donde las células endocrinas se iban organizando para formar el islote. Por IHQ se evidenció la presencia de células alfa en todas las edades, ubicándose principalmente en la periferia del islote, manteniéndose como las células de mayor presentación hasta la edad de un mes. Se observaron células beta en todas las edades, manteniendo una posición central, siendo el principal grupo celular en juveniles y adultos. Las células PP fue el tercer grupo celular, su ubicación fue periférica y en adultos se observaron los llamados “islotes ricos PP”. Las células delta fue el cuarto tipo celular, fueron pocas y ubicadas de manera aleatoria en el islote excepto en fetos y adultos donde fueron ausentes. En el estudio de microscopia electrónica de barrido (SEM), la presencia de islotes de Langerhans se dio en crías, juveniles y adultos, pero en fetos de último tercio de gestación no fue observado.

Palabras claves: Alpaca, inmunohistoquímica, morfología, páncreas, SEM.

ABSTRACT

The aim of this study was to describe the microscopic architecture of the prenatal and postnatal development of the endocrine pancreas of alpaca. The experimental part was made in Cusco, in the experimental station IVITA Marangani, Peru. Processed samples in the area of research morphological of the LAAFS FMV UNMSM. Used 40 alpacas between fetuses of last third of gestation, pups, young and adult, from discarded by defects congenital or intended for the slaughterhouse. Histological sections of 5 μm thick is worked with coloration H-E and Immunohistochemistry (IHC) techniques using kits of SWI, Polyclonal Antibodies (anti-glucagon and anti-SSTR3, anti-PP) and antibody monoclonal (anti-insulin) to identify endocrine cells, following ABC Immunohistochemistry Protocol. The reading of the blades was binocular microscope Leica DM750 with built-in digital camera and software of measurement for the calculation of areas. The intensity of the dial was classified qualitatively. The positive control was rat páncreas. Islets of Langerhans at all ages studied except for fetuses, where endocrine cells were organized to form the islet was evidenced. By IHC evidenced the presence of Alpha cells in all ages, mainly located in the periphery of the island, staying as the greater-presenting cells up to the age of one month. Beta cells at all ages, keeping a central position, being the main cell group in juveniles and adults were observed. PP cells was the third cell group, its location was peripheral and the so-called "rich islets PP" were observed in adults. Delta cells was the fourth cell type, they were few and located randomly in the island except in fetuses and adults where they were absent. In the study of scanning electron microscopy (SEM), the presence of islets of Langerhans occurred in calves, juveniles and adults, but in the last third of pregnancy fetuses was not observed.

Key Words: Alpaca, immunohistochemistry, morphology, pancreas, SEM.

LISTA DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1 Anticuerpos utilizados para IHQ en islotes endocrinos pancreáticos	14
Cuadro 2 Reactivos utilizados para IHQ en islotes endocrinos pancreáticos	15
Cuadro 3 Presencia y patrón de distribución celular del páncreas endocrino en alpaca	35
Cuadro 4A Áreas de marcación positiva por tipo celular alfa y beta	36
Cuadro 4B Áreas de marcación positiva por tipo celular PP y delta	37

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 Fotomicrografía de una sección del páncreas que muestra un islote de Langerhans rodeado de células pancreáticas acinares.	5
Figura 2 Islote de Langerhans H&E.	5
Figura 3 Páncreas normal en humano (SEM).	11
Figura 4 Células dispersas para formación de islote en feto de último tercio de gestación de alpaca.	19
Figura 5 Islote en alpaca recién nacida	19
Figura 6 Formación de Islote en alpaca recién nacida	20
Figura 7 Islote de alpaca de una semana de edad	20
Figura 8 Islote de alpaca de dos semanas de edad	21
Figura 9 Islote de alpaca de un mes de edad	21
Figura 10 Islote de alpaca de cuatro meses de edad	22
Figura 11 Vista normal y ampliada de islote de alpaca de cuatro meses de edad	23
Figura 12 Islotes en alpaca juvenil	23
Figura 13 Vascularización de islote en alpaca juvenil	24
Figura 14 Islote en alpaca adulta	24
Figura 15 Control positivo en páncreas de rata	26
Figura 16 Células productoras de glucagón en islotes pancreáticos de alpaca	27
Figura 17 Células productoras de insulina en islotes pancreáticos de alpaca	29
Figura 18 Células productoras de somatostatina en islotes pancreáticos de alpaca	30-31
Figura 19 Células productoras de polipéptido pancreático en islotes pancreáticos de alpaca	31-32
Figura 20 Descripción ultraestructural de páncreas en feto de último tercio de gestación de alpaca (SEM)	41
Figura 21 Descripción ultraestructural de páncreas en cría de alpaca de un mes de edad (SEM)	41
Figura 22 Descripción ultraestructural de páncreas en alpaca juvenil (SEM)	42
Figura 23 Descripción ultraestructural de páncreas en alpaca adulta (SEM)	42

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1 Protocolo inmunohistoquímica ABC	51-52
Anexo 2 Protocolo de microscopia electrónica de barrido	53
Anexo 3 Edad y peso de animales	54-55

I. INTRODUCCIÓN

La alpaca (*Vicugna pacos*) es un camélido sudamericano doméstico que constituye un recurso genético de gran importancia social, económica y cultural para las regiones alto andinas de Sudamérica. Provee productos de alta calidad, como son la fibra y la carne, produciéndolas con gran eficiencia a partir de pastos pobres las alturas. Además, ofrece subproductos como pieles y cueros que tienen múltiples usos industriales y artesanales. A menudo, constituye el único medio de subsistencia de un vasto sector de la población alto andina donde no es posible la agricultura ni la crianza de otras especies de animales domésticos (FAO, 2005).

Trabajos realizados anteriormente en camélidos han mencionado que, la estructura de las vísceras y glándulas anexas del aparato digestivo de estos muestran diferencias morfológicas y funcionales en comparación a otros animales, como los rumiantes, especialmente los bovinos (Ghezzi *et al*, 2000).

Pérez (2016) indica que desde el punto de vista de la medicina veterinaria y de la salud de los animales, es fundamental conocer la anatomía normal del aparato digestivo, ya que asociado a las variaciones fisiológicas y a partir del examen clínico del animal o la interpretación de los hallazgos de necropsias, es posible diferenciar lo normal de lo anormal.

Es de conocimiento que las alpacas adultas mantienen una glicemia elevada, considerándose un estado normal de salud, a diferencia de lo que sucede en crías que si pueden reducir la glicemia elevada y cuyo mecanismo no ha sido completamente estudiado. Teniendo el páncreas un rol importante en esta problemática, no se cuenta con un perfil morfológico del páncreas endocrino de la alpaca a diferentes edades.

Por esta razón, se formó un proyecto global en el que se investigó el páncreas, el cuál

buscó diferenciarlo macro y microestructuralmente, así como también sus indicadores funcionales y su relación con el tejido intestinal, en la alpaca a diferentes edades. Siendo el presente trabajo enfocado al estudio micro y ultraestructural e inmunohistoquímico del desarrollo prenatal y postnatal del páncreas endocrino de la alpaca (*Vicugna pacos*), abarcó la identificación y descripción de las características microscópicas de este y mediante inmunohistoquímica se identificaron los tipos de células secretoras. Finalmente se realizó la descripción de la estructura del páncreas endocrino de la alpaca (*Vicugna pacos*) por medio de microscopía electrónica de barrido.

Este conocimiento contribuirá en el entendimiento de la funcionalidad del páncreas endocrino y su implicancia en la fisiología y metabolismo de este animal, que presenta diferencias notorias con otras especies, como la tolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina, peculiares características presentes en esta especie.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. Generalidades

Tradicionalmente la alpaca (*Lama pacos*, Linneaus, 1758), la llama (*Lama glama*, Linneaus, 1758), y el guanaco (*Lama guanicoe*, Müller, 1776), han sido especies clasificadas como cercanas al género *Lama*, mientras que la vicuña (*Vicugna vicugna*, Molina, 1782) fue encuadrada en un género separado *Vicugna*. Estudios más recientes usando ADN mitocondrial sugieren que la vicuña y el guanaco fueron los antecesores de la alpaca y la llama respectivamente, por lo que se ha propuesto una nueva clasificación taxonómica para la alpaca de *Vicugna pacos* (Paredes, 2012).

Existen dos razas de alpacas, Huacaya y Suri. Siendo la Huacaya la más abundante con aproximadamente el 80% del total de alpacas en el Perú y se caracteriza por tener fibra de crecimiento perpendicular al cuerpo. La raza Suri tiene una menor población y se caracteriza por tener fibra lacia, ligeramente ondulada que cae a los costados del animal (Pezo, 2010).

En Perú se registró una población total de 3685542 cabezas de alpaca en el censo nacional del año 2012. La raza Huacaya es la más representativa con 2909212 cabezas, la Suri es de 442013, y dos categorías más, que son los cruzados y capones con una población de 265135 y 69156 cabezas respectivamente. El 39.6% de la población de alpacas se encuentran en el departamento de Puno, el 60.4% se encuentra en los departamentos de Ancash, Apurímac, Arequipa, Ayacucho, Cajamarca, Cusco, Huancavelica, Huánuco, Ica, Junín, La Libertad, Moquegua, Lambayeque, Lima, Moquegua, Pasco, Piura y Tacna (INEI, 2012).

Los camélidos sudamericanos domésticos junto con los ovinos en menor escala son los principales medios de utilización productiva de extensas áreas de pastos naturales en las zonas

alto andinas donde se dificulta la agricultura y la crianza exitosa de otras especies de animales domésticos, debido a la ventaja que tienen los camélidos en convertir con eficacia la vegetación nativa de estos ambientes en carne y fibra de alta calidad (Iñiguez y Alem, 1996).

El páncreas en camélidos sudamericanos tiene una estructura lobulada y es de un color amarillo pálido (formolizado) (Navarrete y Sato, 2010), Panesi (2016) describe que el páncreas de la alpaca tiene una coloración rosa pálido (en fresco). En cuanto a la lobulación del páncreas, este se compone de un lóbulo izquierdo, un lóbulo derecho y un cuerpo, sin embargo, se observaron diferencias dentro de estos lóbulos (Dyce *et al.*, 1987). Siendo similar al de otros mamíferos (Fowler, 1998; Cebra *et al.*, 2006). Sin embargo, se observa un gran desarrollo del lóbulo izquierdo y reducción del lóbulo derecho (Ghezzi *et al.*, 2000).

2. Histología pancreática

El páncreas es una glándula de función endocrina y exocrina, tiene 4 componentes: el tejido exocrino, los conductos, las células endocrinas y el tejido conectivo. Estos elementos están relacionados íntimamente en ontogenia, anatomía, histología y función (Huaynates, 2015). Formado por el estroma que los divide en lóbulos y lobulillos irregulares, ricos en vasos sanguíneos, conductos excretores y algunas células adiposas (Málaga, 1976).

2.1 Porción endocrina (islotes de Langerhans)

La porción endocrina está formada por pequeñas masas de células endocrinas conocidas como islotes de Langerhans. Al ver de cerca un islote se puede apreciar una rica vasculatura evidenciadas por racimos de células sanguíneas (glóbulos rojos) y células endoteliales (Panesi, 2016).

El páncreas humano tiene de 1 a 2 millones de islotes de Langerhans. Cada islote tiene sólo 0,3 milímetros de diámetro y está organizado alrededor de pequeños capilares, en los que sus células secretan sus hormonas (Hall, 2016).

Los islotes son fácilmente ubicados en ambos lóbulos y se encuentran al azar sin relación alguna con el sistema de conductos y su distribución es uniforme lo cual es similar en otras especies (Hazelwood, 1989; Xu, 1999; Cebra *et al.*, 2006). Estos están ubicados en el tejido intralobular y no en el interlobular como en el ganado vacuno (Bonner, 1980; Cebra *et al.*, 2006).

Definidos por Junqueira y Carneiro (2005), los islotes de Langerhans son micro órganos endocrinos multihormonales; aparecen como grupos redondeados de células incrustadas dentro del tejido pancreático exocrino. Cada islote consiste en células poligonales ligeramente teñidas o redondeadas, dispuestas en cordones separadas por una red de capilares sanguíneos. Figura 1.

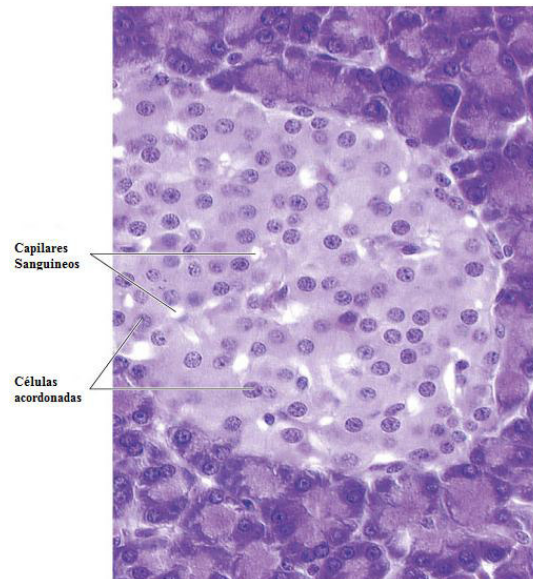


Figura 1. Fotomicrografía de una sección del páncreas que muestra un islote de Langerhans rodeado de células pancreáticas acinares. Las células de los islotes forman cordones separados por capilares sanguíneos, aquí vistos como espacios en blanco. Tinción de H & E. Aumento medio. Fuente: (Junqueira y Carneiro, 2005)

Reportes en humanos, mencionan que los islotes de Langerhans se componen de grupos de hasta 3000 células secretoras sostenidas por una fina red colágena que contiene numerosos capilares fenestrados. Una cápsula delicada rodea cada islote. Las células endocrinas son pequeñas con un citoplasma granular pálido: en contraste, las células grandes de los acinos pancreáticos exocrinos circundantes manchan fuertemente (Young *et al.*, 2013). Como se puede observar en la Figura 2.

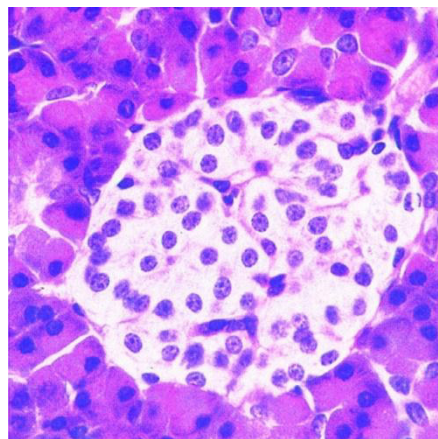


Figura 2. Islote de Langerhans H&E. Fuente: (Young *et al.*, 2013).

En el camello, los islotes muestran diferentes formas, que variaban de forma redonda, ovalada, alargada a irregular (Al-Ani, 1987; Sultan, 1999; Mustafa, 2007; Cassanova, 2016). Sultan (1999) ha afirmado que los islotes interlobulares de Langerhans presentes eran mucho más pequeños que los islotes intralobulares. Algunos de los islotes intralobulares estaban situados cerca de los conductos, mientras que otros eran conectados por delgadas cuerdas epiteliales al conducto en el camello (Sultan, 1999).

2.2 Componente celular y su función

El tejido endocrino está organizado en pequeños grupos celulares esféricos, llamados islotes de Langerhans (Lis *et al.*, 2003). Los islotes presentan variados tamaños y formas, su distribución en el parénquima pancreático es irregular (Panesi, 2016). Cada islote está compuesto de cuatro tipos celulares alfa, beta, delta y las células del polipéptido pancreático (PP), que producen y secretan las hormonas glucagón, insulina, somatostatina y polipéptido pancreático, respectivamente (Cabrera *et al.*, 2006).

2.2.1. Célula alfa (α)

El glucagón, se encuentra almacenado en el interior de la célula α , en forma de gránulos electrodensos, con un manto periférico característico (Deconinck *et al.*, 1971). El glucagón es la hormona contrareguladora de la insulina, que junto a ésta se encarga del mantenimiento del equilibrio homeostático de la glucosa (Duning y Gerich, 2007). Aunque actúa sobre múltiples tejidos, su principal diana metabólica es el hígado, dónde estimula la glucogenólisis y la gluconeogénesis, e inhibe a su vez los procesos de glucolisis y glucogenogénesis. De esta manera el glucagón favorece la movilización y producción hepática de glucosa, inhibiendo el almacenamiento de la misma. Además, existen estudios realizados en ratón que demuestran que el glucagón inhibe la síntesis y secreción de triglicéridos y favorece la lipólisis (Slavin *et al.*, 1994; Longuet *et al.*, 2008).

Las células α eran pocas en comparación con las células beta y estaban situados en la periferia de los islotes, pero su ubicación central no era rara. La localización periférica de estas en los islotes parecía ser la regla general para la gran mayoría de los animales domésticos. Sin embargo de nuevo el caballo parecía ser la excepción ya que las células alfa se localizaban centralmente en los islotes (Sultan, 1999; Hafez *et al.*, 2015).

2.2.2. Célula beta (β)

El grupo celular de mayor abundancia en el páncreas endocrino está conformado por las células β (entre el 50 y 80% del total celular) (Brissova *et al.*, 2005; Cabrera *et al.*, 2006). La localización central de estas en los islotes parecía ser la norma general para la gran mayoría de los animales domésticos, sin embargo en el caballo pudo ser encontrada en la periferia (Sultan, 1999; Hafez *et al.*, 2015). En el camello, estas células tienen un núcleo oval y arreglado en cordones (Sultan, 1999).

La célula β juega un papel central en la homeostasis de los nutrientes que llegan al organismo a través de la dieta, no solo por ser capaz de fabricar y secretar la insulina, sino además por hacer que dicha secreción sea en el momento justo y la cantidad adecuada (Roche, 2007).

2.2.3. Células delta (δ)

La localización periférica en el islote pancreático de las células delta se mantiene en bovinos, caballos y camellos, aunque en el camello la localización también pueda ser central (Hafez *et al.*, 2015).

La somatostatina (SST), aislada primero del hipotálamo (Brazeau *et al.*, 1973), ejerce de modo paracrino una actividad inhibitoria en la secreción de las otras tres hormonas que produce el islote. Tiene como principal efecto modular la absorción intestinal de sustratos, inhibiendo las funciones exocrinas y motoras del tracto gastrointestinal. Es posible que en forma indirecta regule la respuesta proporcional de insulina y glucagón de acuerdo a los requerimientos, oferta y disponibilidad de sustratos energéticos. Ello porque existe una compleja interregulación entre las tres hormonas, ejerciendo la somatostatina un efecto inhibitor sobre el glucagón y la insulina (Arteaga *et al.*, 1997).

2.2.4 Células PP (γ)

El polipéptido pancreático (PP) es un péptido que predomina en la región cefálica y corporal del páncreas y se libera en las células PP, localizadas en la periferia de los islotes de Langerhans, pero también en las células acinosas y ductales (Gutiérrez, 1988).

El polipéptido pancreático (PP) tiene como función la regulación de la función

gastrointestinal, mediante su influencia, tanto sobre la secreción pancreática exocrina, como sobre el vaciamiento de la vesícula biliar (Brandan *et al.*, 2006). El PP, que también se ha detectado como producido en el intestino delgado, el cerebro y en los ganglios del sistema autónomo, es considerado como una suerte de modulador del proceso de absorción intestinal, dando una curva de absorción durante el proceso digestivo más suave. Su secreción es estimulada cuando se produce abundante ingestión de proteínas, durante el ayuno, el ejercicio y la hipoglucemia aguda. La administración de glucosa intravenosa y la ya citada somatostatina inhiben su secreción. Se ha reconocido que también se encuentra bajo control colinérgico ya que su concentración en sangre cae después de la administración de atropina (Lis *et al.*, 2003).

3. Morfogénesis

La morfogénesis y la diferenciación del páncreas y sus tipos celulares son muy conservados entre los vertebrados durante el desarrollo fetal. El páncreas se desarrolla como una estructura de yemas simples en el tubo del intestino primitivo a un órgano muy ramificado con muchos tipos de células especializadas (Kim y MacDonald, 2002). Los tres tipos celulares más importantes del páncreas son las células ductales, acinares y endocrinas, estas tienen un origen embriológico común a pesar de tener estructura y funciones claramente diferenciadas (Noguchi, 2010).

El proceso de diferenciación celular en el páncreas endocrino comienza en la etapa fetal (Huaynates, 2015). Todas las células de los islotes provienen de células pluripotenciales, tanto en el desarrollo como más adelante en la vida del animal. El desarrollo de las células endocrinas del páncreas depende de una compleja acción secuencial de varios factores de transcripción que garantizan la organogénesis normal y la posterior diferenciación de los diversos tipos de células endocrinas. La organogénesis del páncreas consiste en una secuencia de eventos de inducción, en asociación con la activación de factores de transcripción específicos (Wang *et al.*, 2013).

Microscópicamente el páncreas de la alpaca presenta al nacimiento una citoarquitectura definida, la cual entra en remodelación a la semana de edad y se establece una arquitectura celular parecida a las adultas al mes de edad (Casanova, 2016).

En cerdos el páncreas se desarrolla a partir de los primordios ventral y dorsal. En el día 19 del embrión, se detectan las cuatro células endocrinas sin conductos o acinos. La masa relativa de las células beta a las células alfa aumenta gradualmente de los días 25-34 (más células alfa), ~ 52 (masa igual), a 60 (más células beta). Las células Delta aparecen por primera

vez al día 31, pero rara vez se observan hasta el día 89. Sin formación de islotes, con un núcleo de células beta y otras células endocrinas en la periferia, se observa antes del nacimiento (Hardikar, 2016).

En el ganado, las células alfa son las primeras células endocrinas que aparecen a 26 días post copula en el primordio (dpc) pancreático dorsal y el duodeno, seguidas por las células beta a 27 dpc y las células delta a 45 dpc. Estas células endocrinas se dispersan por separado hasta 50 dpc, y posteriormente, las células beta y alfa comienzan a formar pequeños grupos. En esta etapa, las células alfa siguen siendo dominantes. Entre 89 y 105 dpc, pequeños grupos de células endocrinas se agrupan en grupos más grandes. El número de células beta aumenta y supera las células alfa después de 110 dpc. La arquitectura de los islotes se asemeja a los roedores con un núcleo de células beta con células alfa y delta en la periferia (Hardikar, 2016).

4. Descripción Inmunohistoquímica

Antes de la adopción de los métodos de IHQ se dificultaba la identificación de los componentes celulares de los islotes, llegando incluso a encontrarse algunos islotes en que no se tiñeron las células alfa y beta, y que se llamaron, en ese momento, con el término “Third cell type”, y posteriormente se denominaron “Islotes ricos en células PP” (Baskin, 2015). Pero la adopción del método IHQ permitió el desarrollo de trabajos de identificación de estos tipos celulares en múltiples especies hasta la actualidad (Chuan *et al.*, 2015), por su capacidad de detectar productos intercelulares específicos (Young *et al.*, 2013)

En camellos, equinos y bovinos, los islotes pancreáticos se observaron como áreas compactas de células pálidas rodeadas por un tejido exocrino oscuro. Con respecto a la inmunoreacción como en la mayoría de los mamíferos, las células beta fueron las más abundantes, seguidas de glucagón, somatostatina y polipéptido pancreático F o PP en menor número, sin embargo, en los bovinos las células PP fueron secundarias a las células en porcentaje. En el caballo se destaca la diferencia en la distribución de las células alfa y beta en el islote pancreático, donde las células alfa se localizaban en el centro del islote rodeadas por las células beta. En el caso del camello, se observó que las células beta están distribuidas a lo largo del islote en el centro y la periferia, siendo las células α observadas principalmente como grupos en el área periférica. A través del islote, se encontraron grupos de pocas células delta y unas cuantas células de PP dispersas. En el bovino, las células beta se distribuyeron a lo largo de los islotes. Otras células ocuparon una localización más periférica. Las diferencias físicas en la distribución de las células endocrinas pueden dar lugar a diferencias en la necesidad y la

interacción de las hormonas entre sí en diferentes especies (Hafez *et al.*, 2015)

En estudios realizados en islotes de ratón, la mayoría de las células inmunorreactivas a la insulina se localizaron en la región central, y las células de glucagón, somatostatina y PP se localizaron en la región periférica independientemente del lóbulo. En la parte esplénica, también se localizaron células de glucagón en las regiones centrales, y se detectaron más células de somatostatina en las regiones centrales en comparación con las de la parte duodenal (Ku and Lee, 2006).

En el gerbo se utilizó el método inmunohistoquímico peroxidasa-antiperoxidasa (PAP) con cuatro tipos de antisueros específicos contra la insulina, glucagón, somatostatina y polipéptido pancreático (PP). Los islotes pancreáticos se subdividieron en tres porciones (región central, zona del manto y región periférica). Las células estuvieron presentes en las regiones centrales con alta frecuencia, y algunas de estas células también se demostraron en las zonas del manto. Las células inmunorreactivas de glucagón se restringieron principalmente a las zonas del manto. Sin embargo, se encontraron raros ejemplos en las regiones periféricas. En cuanto a las células inmunorreactivas de glucagón, se detectaron células inmunorreactivas de somatostatina en las zonas del manto y regiones periféricas con frecuencias moderadas y raras, respectivamente. Se encontraron células inmunorreactivas de PP en las zonas del manto y regiones periféricas con frecuencias raras y moderadas, respectivamente. En el manto y en las regiones periféricas, el proceso citoplasmático de las células inmunorreactivas de glucagón, somatostatina y PP se entremezcló. (Ku *et al.*, 2001)

5. Microscopía electrónica

Vázquez y Echevarría (2000) explican que el conocimiento de la estructura celular experimentó una verdadera revolución en la segunda mitad del siglo XX gracias al desarrollo de la microscopía electrónica. Más de cuarenta años de la aplicación a la biología no han agotado la utilidad de la microscopía electrónica. Lejos de ello, el desarrollo de la inmunocitoquímica, de los sistemas computacionales de análisis de imágenes, y la complementariedad ofrecida por la microscopía óptica con focal son algunos de los avances que han dado nuevo vigor y han redoblado el interés por la utilización biológica de la microscopía electrónica, tanto de transmisión como de barrido. Estos procedimientos permiten la visualización ultraestructural directa de diversos entes biológicos en la forma lo más cercanamente parecida a su estado natural.

Sindhu *et al.*, (2015) utilizando microscopia electrónica de barrido en humanos observó que el tejido parenquimatoso pancreático normal estaba compuesto de pequeños lóbulos separados por una delgada capa de tejido conectivo. Los islotes de Langerhans fueron vistos como un grupo bien definido de células especializadas dispersas en el parénquima. Los conductos de drenaje fueron vistos alineados por el epitelio liso y también se observaron múltiples aberturas de conductos laterales pequeños en la pared del conducto. Figura 3.

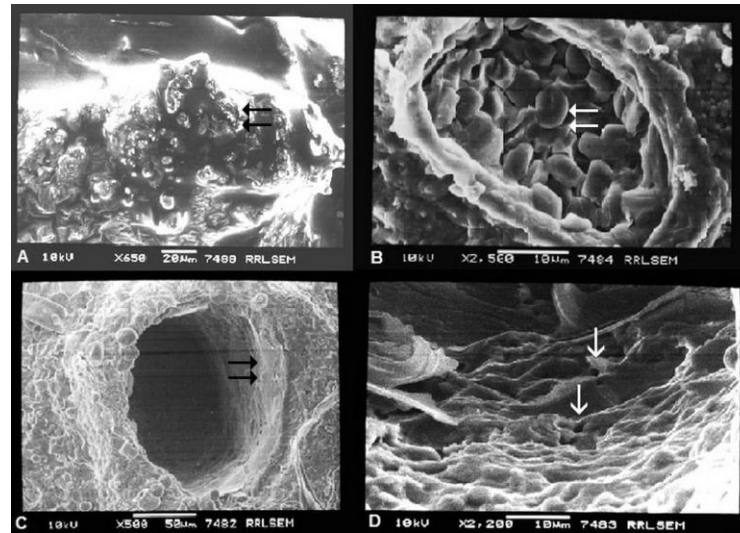


Figura 3. Páncreas normal en humano (SEM). A: Parénquima pancreático normal visto como lóbulo separado por tejido conectivo. B: Islotes de Langerhans en páncreas normal. C: El conducto pancreático normal está revestido de epitelio liso. D: Pared normal del conducto pancreático que muestra las aberturas del conducto lateral. Fuente: (Sindhu *et al.*, 2015)

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de ejecución y periodo de duración

La toma de muestra se realizó en la estación experimental IVITA Maranganí, localizada en la Provincia de Canchis en el Departamento de Cusco, a 4300 msnm durante los años 2015 y 2016. El procesamiento de las muestras se llevó a cabo en la misma estación y en el área de investigación morfológica “Alberto Sato Sato” del Laboratorio de Anatomía Animal y Fauna Silvestre de la Facultad de Medicina Veterinaria UNMSM en Lima. La lectura y análisis de las láminas se realizó en la sección de Ictiopatología del Laboratorio de Histología, Embriología y Patología Veterinaria de la misma facultad. Las pruebas de microscopía electrónica de barrido se realizaron en el Laboratorio de Equipamiento Especializado de la Facultad de Ciencias Biológicas UNMSM en Lima.

Descripción del material experimental

Se emplearon 40 alpacas entre fetos, recién nacidas, crías, jóvenes y adultas de raza Huacaya, detallados de la siguiente manera:

Grupo 1:	Fetos de último tercio de gestación.
Grupo 2:	Recién nacidos sin toma de calostro
Grupo 3:	1 semana de edad
Grupo 4:	2 semanas de edad
Grupo 5:	30 días de edad
Grupo 6:	4 meses de edad
Grupo 7:	Juveniles de 1 año de edad
Grupo 8:	Adultos mayores de 2 años de edad

Para la obtención de los fetos de último tercio de gestación y recién nacidas, se trabajó con hembras preñadas de características fenotípicas no deseadas obtenidas de comunidades alpaqueras con registro de empadre. La edad gestacional en los fetos fue determinada utilizando como referencia las medidas biométricas (diámetro biparietal fetal o BPD), las cuales siguen un patrón de desarrollo constante durante la etapa fetal. El BPD es la medida transversal al eje occipitofrontal, es el espacio virtual entre los lados externos de los huesos temporoparietales del cráneo del feto de la alpaca (Gazitua *et al.* 2001). Las crías, jóvenes y adultas utilizadas tenían registro de nacimiento en las comunidades alpaqueras. Se procedió al registro de los animales aparentemente sanos, teniendo en cuenta la edad y sexo.

Términos de ética

Todas las alpacas utilizadas en este trabajo fueron obtenidas de comunidades alpaqueras destinadas a camal o descarte por fenotipo, de acuerdo a las normas establecidas por el comité de ética y bienestar animal de la FMV-UNMSM.

Toma y procesamiento de muestras

Se realizó eutanasia con sobredosis de pentobarbital sódico (Halatal 10mg/kg) vía vena yugular a los animales. Se procedió a la apertura de la cavidad abdominal mediante una incisión desde el xifoides hasta la región púbica, luego otra incisión bordeando los arcos costales con el fin de exponer las vísceras y ubicar el páncreas.

Se extrajo el páncreas y se conservó en formaldehído bufferado al 10% para ser enviado al laboratorio de Anatomía Animal y Fauna Silvestre de la Facultad de Medicina Veterinaria de la UNMSM. En el laboratorio se procedió a la reducción del órgano y así separar las diferentes porciones de las muestras en el tamaño y las características adecuadas para su estudio.

El páncreas de la alpaca consta de 2 lóbulos (izquierdo y derecho) y 1 cuerpo, cada páncreas fue dividido en 8 secciones: cada lóbulo en 3 porciones (extremo, medio y base) y el cuerpo en dos porciones (extremo y base). Para la reducción, de cada uno de estos segmentos se tomó una sección transversal con un ancho de 3 mm, que incluía tanto la zona cortical como central del páncreas, para su inclusión en parafina. Tomadas dichas secciones, un laboratorio independiente continuó con la elaboración de los bloques parafinados para luego proceder a realizar cortes de 5 μ m de espesor, con los cuales se realizó el montaje en láminas positivadas (Item 1354W - Globe Scientific Inc.).

Histología pancreática endocrina

Los cortes histológicos obtenidos fueron teñidos con Hematoxilina de Mayer – Eosina, estableciéndose el área endócrina y descripción histológica. Las láminas se examinaron con objetivos de 10x y 40x en usando un microscopio binocular marca Leica, modelo DM750 con cámara ICC50 HD acoplada y software LAS 4.7 Leica Macrosystems.

Técnica de inmunohistoquímica

Para la identificación de los diferentes tipos celulares del islote pancreático se empleó la técnica de inmunohistoquímica, utilizando un anticuerpo monoclonal anti-insulina y anticuerpos policlonales anti-glucagón, anti-somatostatina y anti-polipéptido pancreático (cuadro 1), mediante reactivos en kits comerciales para inmunohistoquímica (cuadro 2).

Cuadro 1.- Anticuerpos utilizados para IHQ en islotes endocrinos pancreáticos.

Anticuerpo (tipo)	Fuente	Huésped	Laboratorio	Dilución	Cat. N°
Anti-Insulin B (C-12) (Monoclonal)	Ratón	Porcino	Santa Cruz Biotechnology, INC. www.scbt.com	1:100	SC-377071
		Equino			
		Canino			
Anti-Human Glucagon	Conejo	Bovino	US Biollogical Life Sciences Salem, MA. 01970	1:500	G2040-03D
		Humano			
		Rata			
		Ratón			
Anti-Pancreatic Polypeptide (Policlonal)	Conejo	Porcino	US Biollogical Life Sciences Salem, MA. 01970	1:500	P3000-01
		Bovino			
Anti-SSTR3. (Policlonal)	Conejo	Humano	US Biollogical Life Sciences Salem, MA. 01970	1:500	335588

Cuadro 2.- Reactivos utilizados para IHQ en islotes endocrinos pancreáticos.

Reactivos	Laboratorio	Dilución Óptima	Cat. N°
ImmunoCruz™ mouse ABC Staining	Santa Cruz Biotechnology, INC. www.scbt.com	Provisto por el fabricante.	SC-2017
ImmPACT DAB peroxidase substrate	Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA 94010	30 µl de cromógeno en 1 ml. de diluyente.	SK-4105
Vectastain ABC KIT	Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA 94010	Provisto por el fabricante.	PK-6100

Desarrollo de protocolo:

La técnica de inmunohistoquímica incluyó el tratamiento de las láminas que pasaron por una etapa de desparafinado con Neo Clear® (sustituto de xileno) en dos tiempos de 10 minutos cada uno. Se prosiguió con la hidratación mediante dos inmersiones de 10 minutos en etanol al 100%, se continuo con el bloqueo de la peroxidasa endógena al pasar las láminas por una solución que constaba de 200 ml. de Metanol y 4 ml de agua oxigenada durante 30 minutos.

Se prosiguió con la hidratación mediante pasajes en alcohol en diluciones decrecientes en concentración: 96° (en dos oportunidades), 70°, 50°, por 5 minutos cada pasaje; continuándose con tres lavados en solución buffer fosfato salino (PBS) por 5 minutos cada lavado. Posteriormente, la recuperación antigénica se realizó en solución buffer citrato (estandarizada a pH 6 con HCl) en horno microondas a 750 watts por 10 minutos, dejándose enfriar. Se realizó tres nuevos lavados en solución PBS por 5 minutos cada uno.

La inactivación de uniones inespecíficas se realizó con Albumina de Suero Bovino (BSA) al 1% en cámara húmeda por 30 minutos a temperatura ambiente. La aplicación de los anticuerpos primarios se realizó en cámara húmeda donde reposaron en refrigeración hasta el día siguiente. Al retirar y atemperar la cámara húmeda, se continuó con tres lavados en solución PBS, por 5 minutos cada lavado, para proseguir con la aplicación del anticuerpo secundario (policlonales en ambos casos) en cámara húmeda por 30 minutos, repitiéndose tres lavados en solución PBS, por 5 minutos cada lavado.

Se procedió a aplicar la enzima AB en cámara húmeda y se dejó incubando por 30 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se realizaron tres lavados en solución PBS por

5 minutos cada uno. El revelado se realizó con el cromógeno 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) y se evaluó la aparición de marcación (positividad), la cual se presentó a los 10, 18 20 y 20 minutos para insulina, glucagón, polipéptido pancreático y somatostatina, respectivamente. La reacción se cortó con agua corriente y luego se realizó un enjuague en agua corriente y otro con agua destilada por 5 minutos cada uno, posteriormente se sumergió por 5 segundos en el colorante de contraste Hematoxilina de Harris, y después fue enjuagado con agua corriente para eliminar el excedente de colorante.

Se continuó con la deshidratación mediante inmersiones de 5 minutos cada uno en alcohol 50°, alcohol 70°, alcohol 96° (en dos ocasiones), etanol al 100% (en dos ocasiones) y Neo Clear (también en dos ocasiones), luego se aplicó una gota de Bálsamo de Canadá para el montaje de la lámina cubreobjeto por 10 segundos y finalmente se dejó durante 48 horas para un correcto secado y posterior limpieza de las láminas.

Para validar los anticuerpos, se empleó como control positivo, cortes de páncreas de rata adulta albina (Elayat *et al.*, 1995), mientras que el control negativo interno fue la no marcación de productos sanguíneos en el corte histológico.

Análisis de imágenes

La lectura de las láminas se realizó con el microscopio binocular Leica DM750 con cámara digital ICC50 HD/ incorporada y software de medición LAS 4.7 Leica Microsystems. Se observaron 5 campos por cada lámina, se midió el área total de los islotes y la marcación positiva a cada anticuerpo. La intensidad de la marcación se clasificó cualitativamente como 0 = sin marcación, 1 = marcación leve, 2 = marcación moderada y 3 = marcación fuerte (Zanuzzi, 2010).

Microscopia electrónica de barrido (SEM)

Para observar la ultraestructura pancreática se trabajó con 3 especímenes de páncreas obtenidos de animales con diferentes edades: un feto (último tercio de gestación), un tui (1 año) y un adulto, cada páncreas fue dividido en 8 secciones: cada lóbulo en 3 porciones (extremo, medio y base) y el cuerpo en dos porciones (extremo y base).

De cada sección se tomaron porciones de 3 – 5mm² y fueron procesadas según protocolo en Anexo 2, posteriormente se realizó la lectura en microscopio electrónico de barrido

Marca Inspect™ Modelo S50 con software xT Microscope Control en el laboratorio de equipamiento especializado en la Facultad de Biología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Descripción de las características microscópicas del páncreas endocrino

El páncreas de la alpaca está rodeado por una fina capa de tejido conectivo y revestido por un mesotelio de células planas, esta capa se invagina formando tabiques con un tejido conectivo más laxo, penetrando, formando los lóbulos y pseudolóbulos. En esta capa o membrana externa también se observan pequeños vasos sanguíneos y nervios. Los tabiques contienen fibras colágenas, que rodean los vasos sanguíneos, paquetes nerviosos y los conductos. Esta disposición la presentan todos los animales independientemente de la edad.

Fetos en el último tercio de gestación

No se observó la formación típica del islote de Langerhans en los fetos de último tercio de gestación. Se evidenció la organización inicial de células endocrinas para formar este, las cuales se encontraban cerca a los ductos. El número de células que conforman estas agrupaciones es variable, las células que los conforman son pequeñas y redondas, de núcleo basófilo y citoplasma tenuemente basófilo (Figura 4).

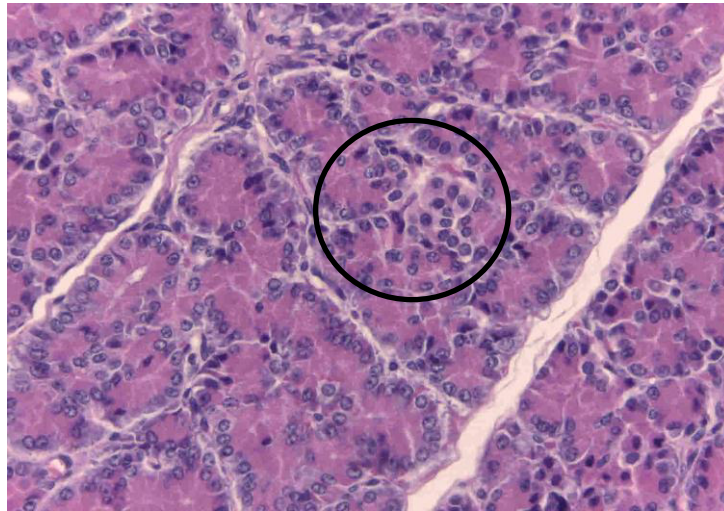


Figura 4. Células dispersas para formación de islote en feto de último tercio de gestación de alpaca. Se observa la organización de pocas células para formar un islote, estas son pequeñas de núcleo basófilo y citoplasma tenuemente basófilo (H-E 400x).

Animales recién nacidos:

Los islotes son irregulares no definidos, formado por células de núcleo basófilo y citoplasma tenuemente basófilo, hay más separación entre las células de los islotes (Figura 5). En el tejido conectivo se encuentran paquetes ordenados de células cúbicas que viene desde un tabique y que migran hacia el centro y tienden hacerse redondas, con tendencia a diferenciarse (Figura 6).

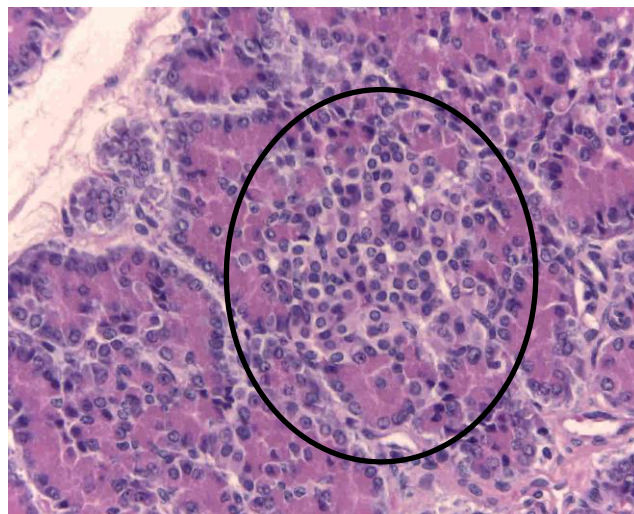


Figura 5. Islote en alpaca recién nacida. Se observa un islote difuso, formado por células de núcleo basófilo y citoplasma tenuemente basófilo (H-E 400x).

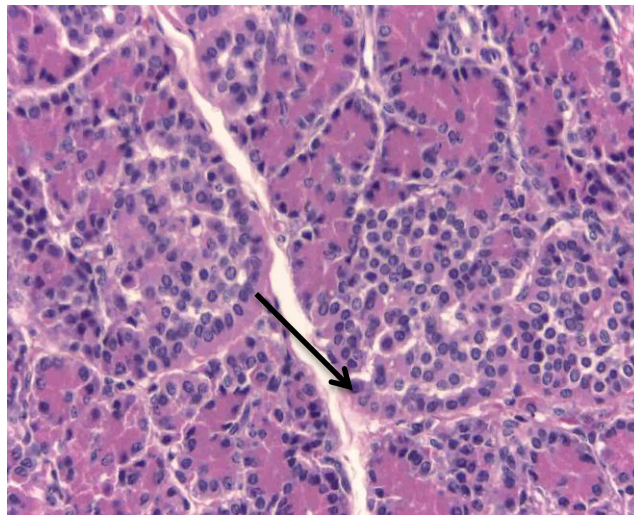


Figura 6. Formación de Islote en alpaca recién nacida. Se indica cordones celulares provenientes del tabique con tendencia a formar islotes (H-E 400x).

Animales de 7 días

Hay menor actividad celular a diferencia de las células acinares, las células de los islotes son redondas de citoplasma claro, en el núcleo se observa la cromatina dispersa y en otros se observa condensación de la cromatina, en algunas áreas no hay detalle celular definido (Figura 7).

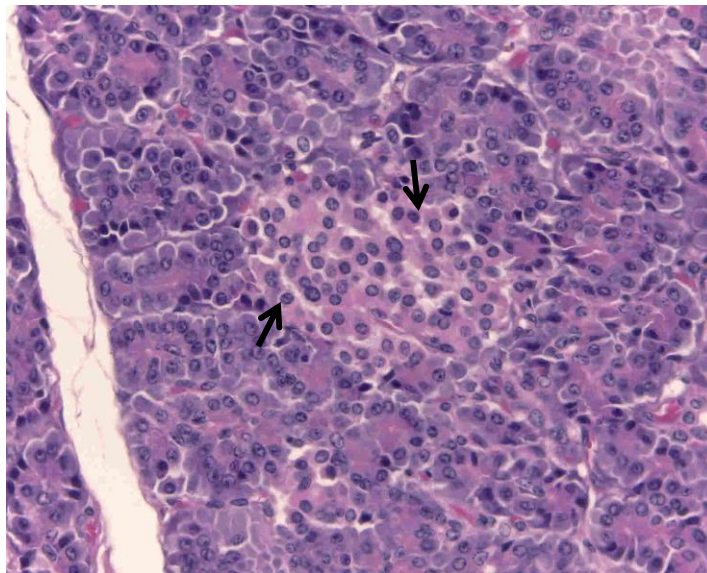


Figura 7. Islote de alpaca de una semana de edad. La condensación de la cromatina y dispersión de la cromatina se encuentran señaladas por las flechas (H-E 400x).

Animales de 15 días

Los islotes tienen la cromatina muy granular, citoplasma acidófilo tenue y encontrándose más claros (Figura 8), que son la mayoría, y otros más intensamente basófilos. En los núcleos más claros la cromatina se dispersa. Hay islotes de diferentes tamaños de pequeños a grandes siendo estos nodulares o irregulares.

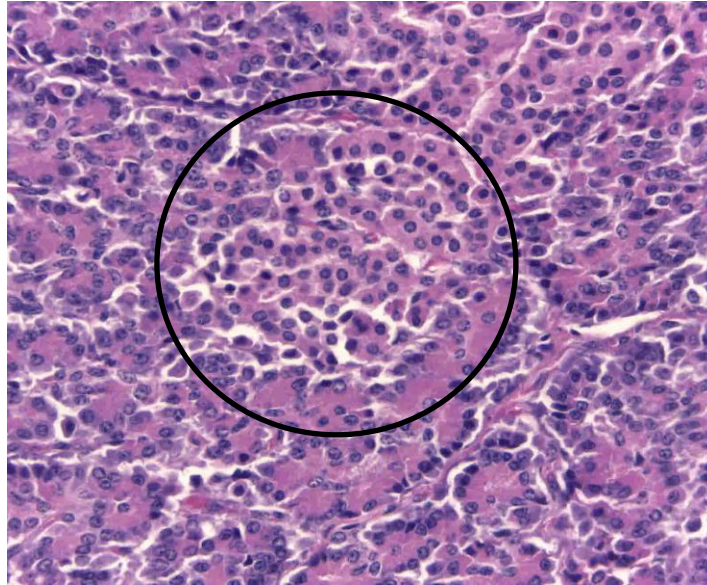


Figura 8. Islote de alpaca de dos semanas de edad. El círculo encierra un islote pancreático formado por células redondas de núcleo basófilo y citoplasma acidófilo (H-E 400x).

Animales de un mes de edad

El islote se ve como un grupo celular no definido de células más pequeñas y redondas, en comparación a las células secretoras de los acinos, de núcleo bien basófilo y de citoplasma claro (Figura 9). Por lóbulo se pueden contar de 2 a 4 islotes.

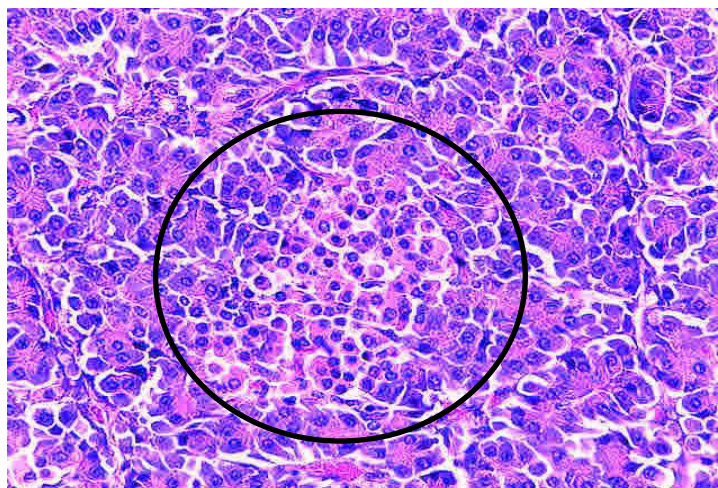


Figura 9. Islote de alpaca de un mes de edad. En el círculo se observa un Islote de Langerhans formado por grupos células pequeñas y redondas de citoplasma acidófilo (H-E 400x).

Los islotes son de distintos tamaños y formas, algunos redondos otros irregulares, los cuales en algunos campos se pueden visualizar rodeados por un fino tejido conectivo delicadamente separado por una única capa de células planas equidistantes y la presencia de discretos capilares (Figura 10).

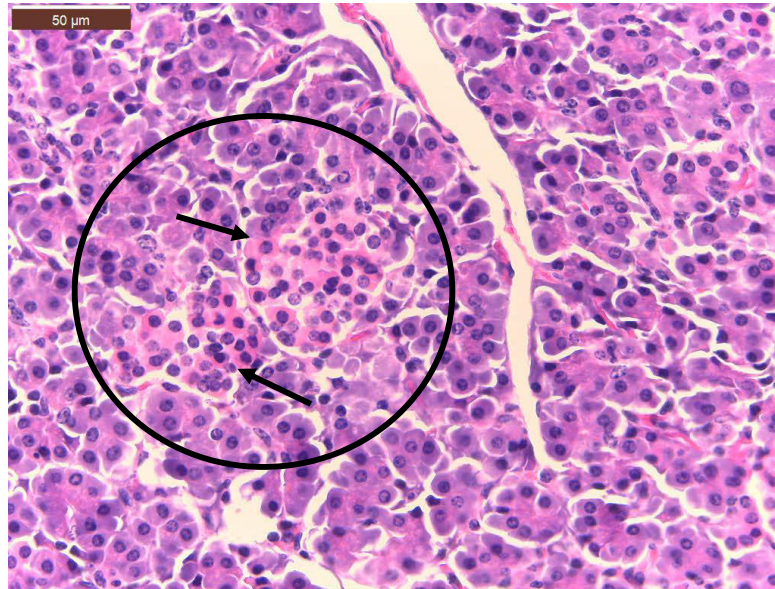


Figura 10. Islote de alpaca de cuatro meses de edad. Los islotes son escasos por campo y en algunas ocasiones se pueden observar de 2 a 3 islotes juntos (flechas). No se observa un patrón de distribución en la localización de los mismos. (H-E 400x)

En el interior las células son de forma poliédricas tienen núcleo central basófilo y un evidente citoplasma acidófilo y se disponen conglomeradamente. Las células presentan una variada intensidad de la tonalidad acidófila del citoplasma, algunas, las más grandes son intensamente acidófilas en su citoplasma y su núcleo intensamente basófilo, en cuyo interior se puede observar la cromatina dispuesta a manera de grumos y en la mayoría de los casos en la periferia. En otras células del islote se observa que la acidofilia del citoplasma es tenue, similar al núcleo donde no tiñe intensamente (Figura 11).

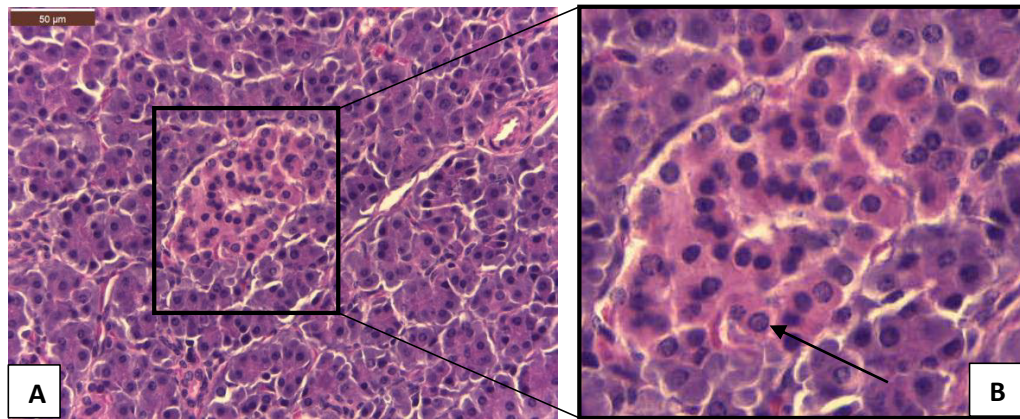


Figura 11. Vista normal y ampliada de islote de alpaca de cuatro meses de edad. La mayoría de células del islote presentan citoplasma acidófilo (A). La cromatina (flecha) de estas células se manifiesta en la periferia (B). (H-E 400x)

Animales juveniles

Se observan los islotes de Langerhans como zonas teñidas acidófilas más pálidas entremezcladas con los acinos glandulares (Figura 12). Las células endocrinas dentro de los islotes son células poliédricas de núcleo central basófilo y citoplasma acidófilo claro, las cuales no presentan granulaciones en su interior, además se encuentran distribuidas como cordones irregulares alrededor de capilares (Figura 13), los cuales reciben las hormonas secretadas.

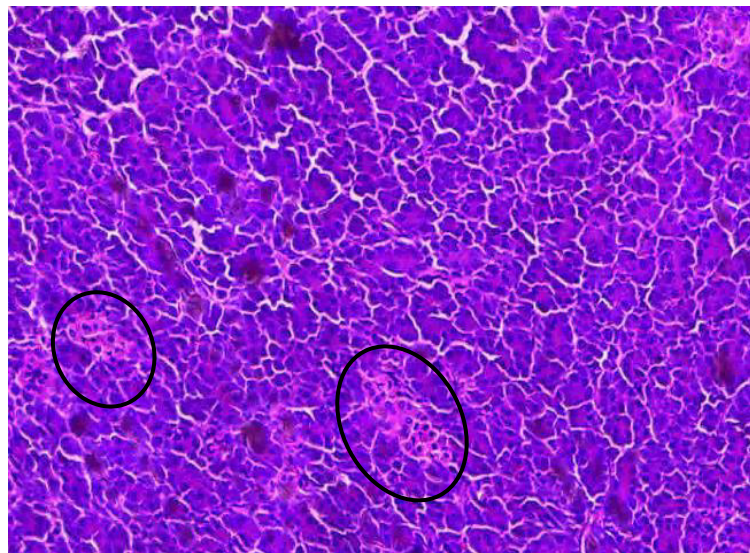


Figura 12. Islotes en alpaca juvenil. Islotes de Langerhans (grupos celulares acidófilos pálidos) (H-E 100x)

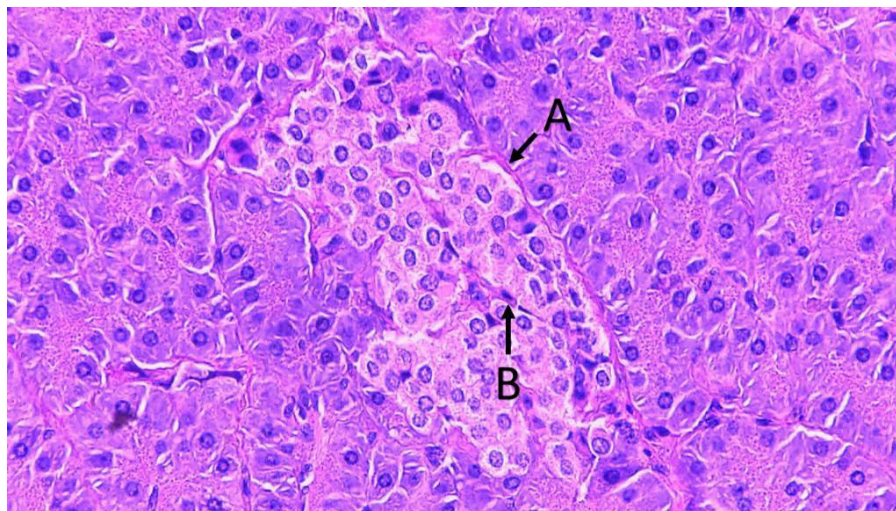


Figura 13. Vascularización de islote en alpaca juvenil. **A.** Se aprecia una rica vasculatura del islote, evidenciadas por racimos de células sanguíneas y células endoteliales. **B.** Presencia de células endoteliales rodeando el islote de Langerhans (H-E 400x)

Animales adultos

La conformación histológica es muy similar al juvenil donde se pueden evidenciar islotes en diferentes formas, predominando los difusos rodeados por tejido exocrino (Figura 14).

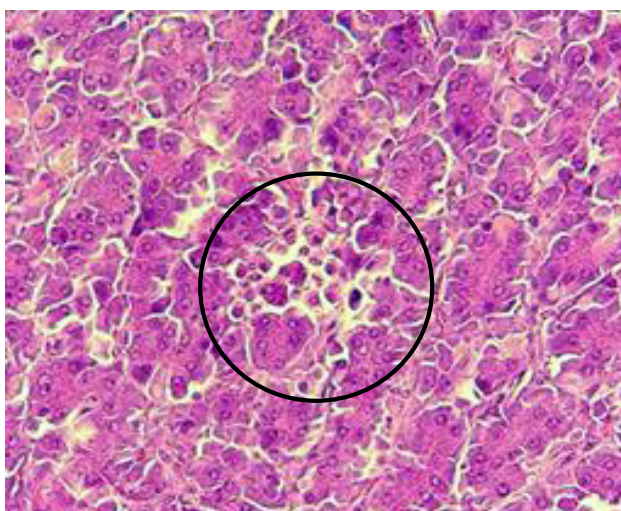


Figura 14. Islote en alpaca adulta. Se observa un islote pancreático de contorno irregular, rodeado de tejido exocrino. (H-E 400x)

En el presente estudio del páncreas endocrino de la alpaca, a nivel histológico, se observó que la porción endocrina (Islotes de Langerhans) estuvo formada por un conjunto de células endocrinas, con una rica vasculatura que lo rodea, evidenciado por racimos de células sanguíneas y células endoteliales. Los islotes pancreáticos de la alpaca en general presentan formas compactas y también difusas, la distribución en el parénquima pancreático fue irregular, lo que concuerda con lo descrito por Panesi (2016). En el feto de último tercio de gestación de

alpaca, se pudo observar que las células endocrinas iban agrupándose para formar el islote pancreático, predominando las células alfa y beta, evidenciándose la formación de islotes en el recién nacido.

En la mayoría de cortes histológicos pancreáticos de alpaca observamos islotes de diversas formas, difusos y compactos, esto lo evidencia Steiner *et al.*, (2010) que menciona que dos tipos de islotes son reconocidos: el difuso y el compacto. Los islotes son del tipo difuso, porque las trabéculas parecen ser más laxas que en los islotes que se encuentran en el resto del páncreas y que se conocen como islotes compactos. Los islotes difusos son más grandes que los islotes compactos. En la mayoría de las especies los islotes compactos están bien circunscritos y separados del tejido exocrino por una delgada capa de colágeno. Esto es menos en el caso de los islotes difusos. Los islotes compactos más grandes, son generalmente considerados hiperplásicos (Klimstra *et al.*, 2007).

Según Steiner *et al.*, (2010), en bovinos, la población relativa de islotes grandes disminuye con la edad, esto lo hemos hallado también en nuestro estudio en alpacas. Informes recientes sobre animales grandes, incluyendo seres humanos, muestran una diferencia en la arquitectura de los islotes, en la que las células endocrinas se distribuyen al azar a través del islote. Esta particular diferencia de especies ha planteado preocupaciones con respecto a la interpretación de datos basados en estudios de roedores para humanos. Por otro lado, se han reportado variaciones adicionales en marsupiales y algunos primates no humanos, que poseen una relación invertida de células β con otras células endocrinas.

Wieczorek *et al.*, (1998) menciona que el tejido endocrino también se ha observado en la proximidad de la superficie externa de los conductos pancreáticos, ya sea como pequeños grupos de células endocrinas, o bien como islotes organizados de Langerhans; en nuestro trabajo hemos corroborado la presencia de células endocrinas dispersas cerca a los conductos principalmente en fetos de último tercio de gestación, mientras que la observación de islotes definidos se evidencio desde el nacimiento así como también células endocrinas dispersas en el tejido exocrino.

2. Determinación mediante inmunohistoquímica de las células productoras de glucagón, insulina, somatostatina y polipéptido pancreático.

A través del estudio inmunohistoquímico se pudo evidenciar la presencia de los cuatro tipos celulares productores de hormonas en el islote pancreático. Existe variabilidad en la

distribución de estas células en el páncreas de la alpaca en las diferentes edades estudiadas.

El control positivo usado en este estudio fue páncreas de rata (Elayat *et al.*, 1995) (Figura 15). Mientras que el control negativo interno fue la no marcación de productos sanguíneos dentro del mismo corte histológico.

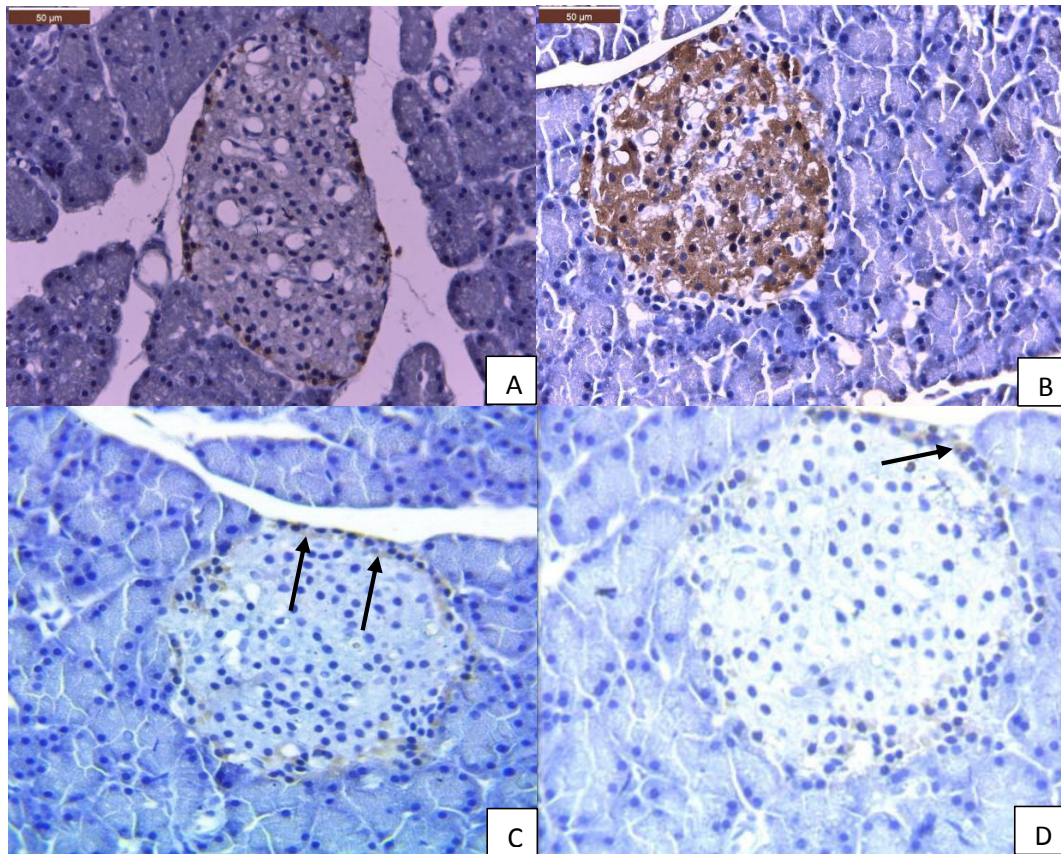


Figura 15. Control positivo en páncreas de rata. A. Glucagón. B. Insulina. C. Polipéptido pancreático. D. Somatostatina. (IHQ, contraste H-E 400x)

Células (α): Glucagón

Se evidenciaron células con reacción positiva a glucagón en islotes de las diferentes regiones del páncreas, predominando en el lóbulo derecho de este. Estas se observaron distribuidas aleatoriamente en los islotes, otras individualmente o en grupos de dos, tres o más células, predominando la ubicación periférica. También se ubicaron células alfa individuales dispersas al azar en el tejido exocrino y a nivel de los ductos.

Pocas células positivas a glucagón fueron observadas cerca a los conductos en fetos de último tercio de gestación.

Se observó marcación para glucagón en grado 2 y 3 en los islotes pancreáticos de todos

los grupos, observándose una distribución en crías hacia el centro del islote, mientras que después del mes de edad, las células marcadas aparecieron principalmente en la periferia (Figura 16).

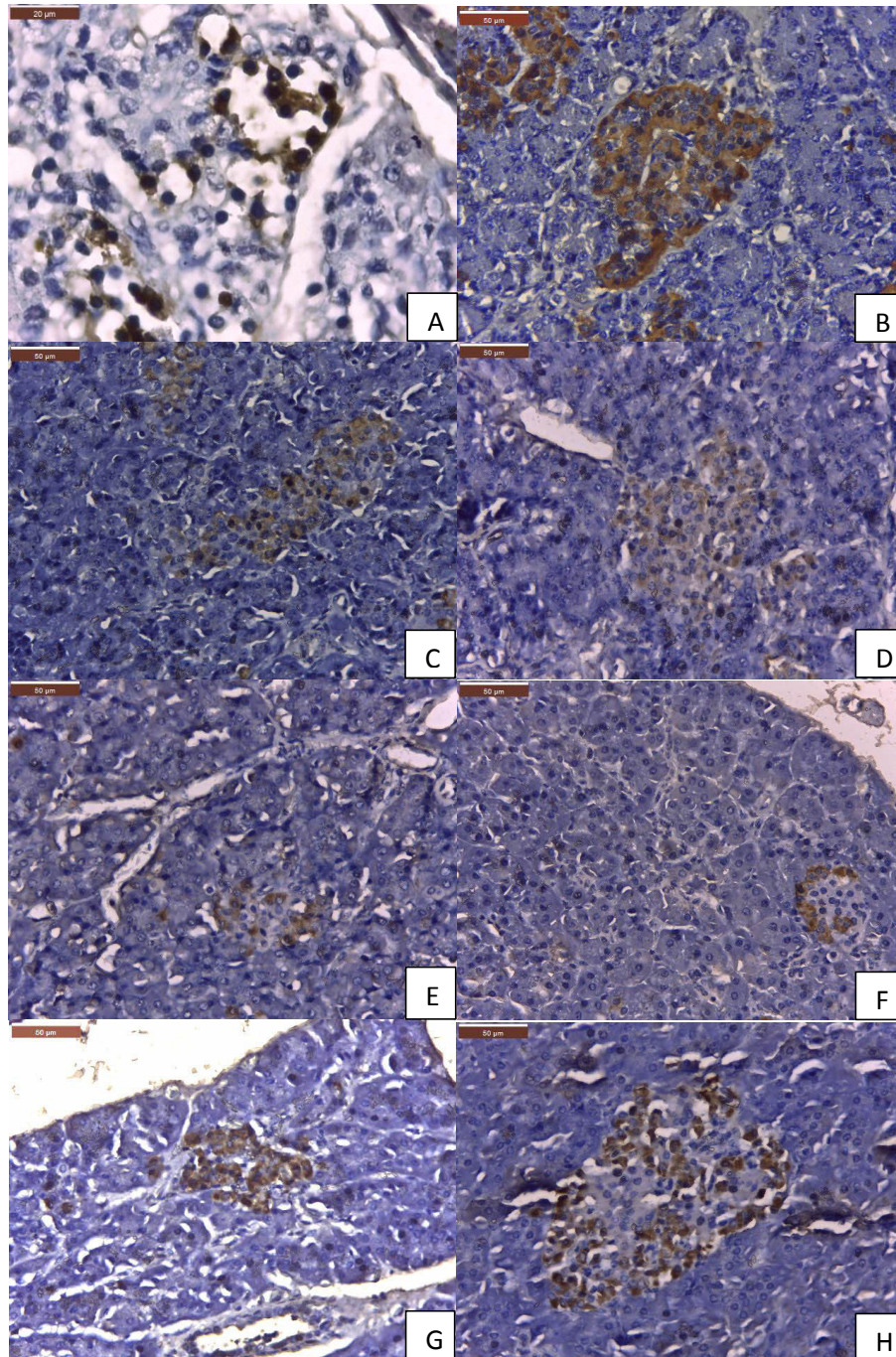


Figura 16. Células productoras de glucagón en islotes pancreáticos de alpaca (IHQ, contraste H-E 1000x **A**, H-E 400x **B-H**). **A**. Pocas células positivas a glucagón cerca a los conductos en fetos de último tercio de gestación, lóbulo izquierdo. **B**. Islote con abundantes células positivas a glucagón ubicadas en el centro del islote en el cuerpo pancreático en alpaca recién nacida. **C**. Islote difuso en lóbulo izquierdo pancreático de cría de alpaca de una semana de edad que evidencia células positivas a glucagón dispersándose del centro del islote a la periferia. **D**. Dos islotes pancreáticos con marcación positiva a glucagón en crías de alpaca de dos semanas de edad en lóbulo derecho, las células se dispersan hacia la periferia del islote. **E**. Islote pancreático en lóbulo derecho de alpaca de un mes de edad que evidencia células positivas a

glucagón en la periferia del islote. **F.** Islote pancreático con marcación positiva a glucagón en la periferia en alpacas de 4 meses de edad. **G.** Marcación fuerte positiva para glucagón en casi la totalidad del islote en lóbulo derecho pancreático en alpaca juvenil. **H.** Mayor cantidad de células positivas a glucagón en islote difuso del lóbulo izquierdo pancreático en alpaca adulta manteniéndose la distribución periférica.

Células (β): Insulina

El patrón de distribución de las células beta en el islote pancreático de alpaca fue diverso. Se observó la presencia de células beta en los islotes con distribución centrípeta, polar, aleatoria, periférica, en racimo y células beta aisladas, pero predominó la tendencia de éstas hacia el eje central del islote en todas las regiones del páncreas.

En fetos de último tercio de gestación se observó una moderada cantidad de células positivas a insulina de manera dispersa cerca de los conductos, sin una formación visible de islote de Langerhans.

Durante la lectura de láminas fue constante la presencia de células beta individuales o solitarias distribuidas al azar en la porción exocrina del páncreas. Islotes con células negativas a insulina fueron escasos, constituyendo menos del 10% del total de islotes evaluados. La marcación en grado 2 y 3 en células productoras de insulina fue predominante en todas las edades de alpaca estudiadas (Figura 17).

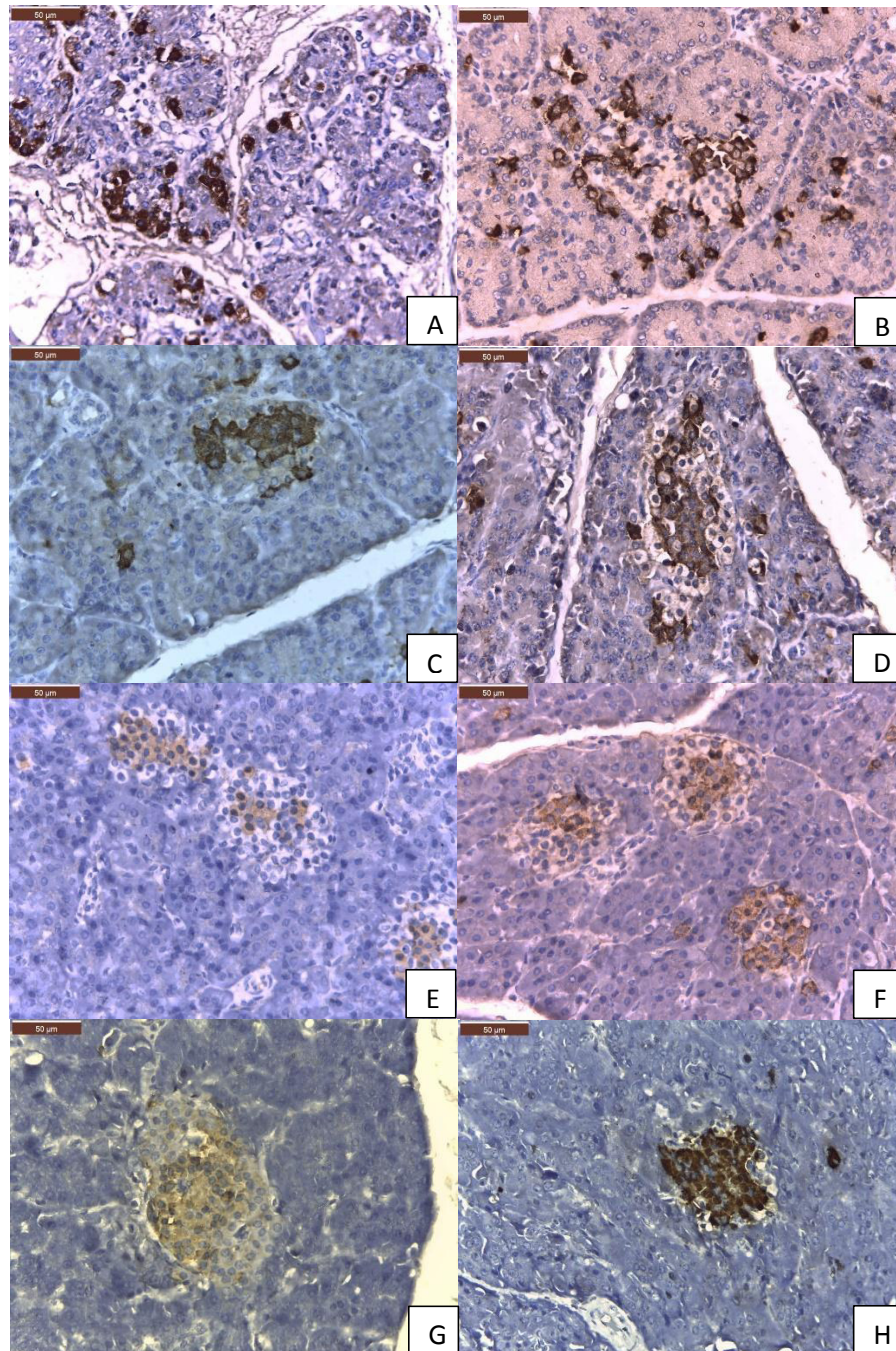


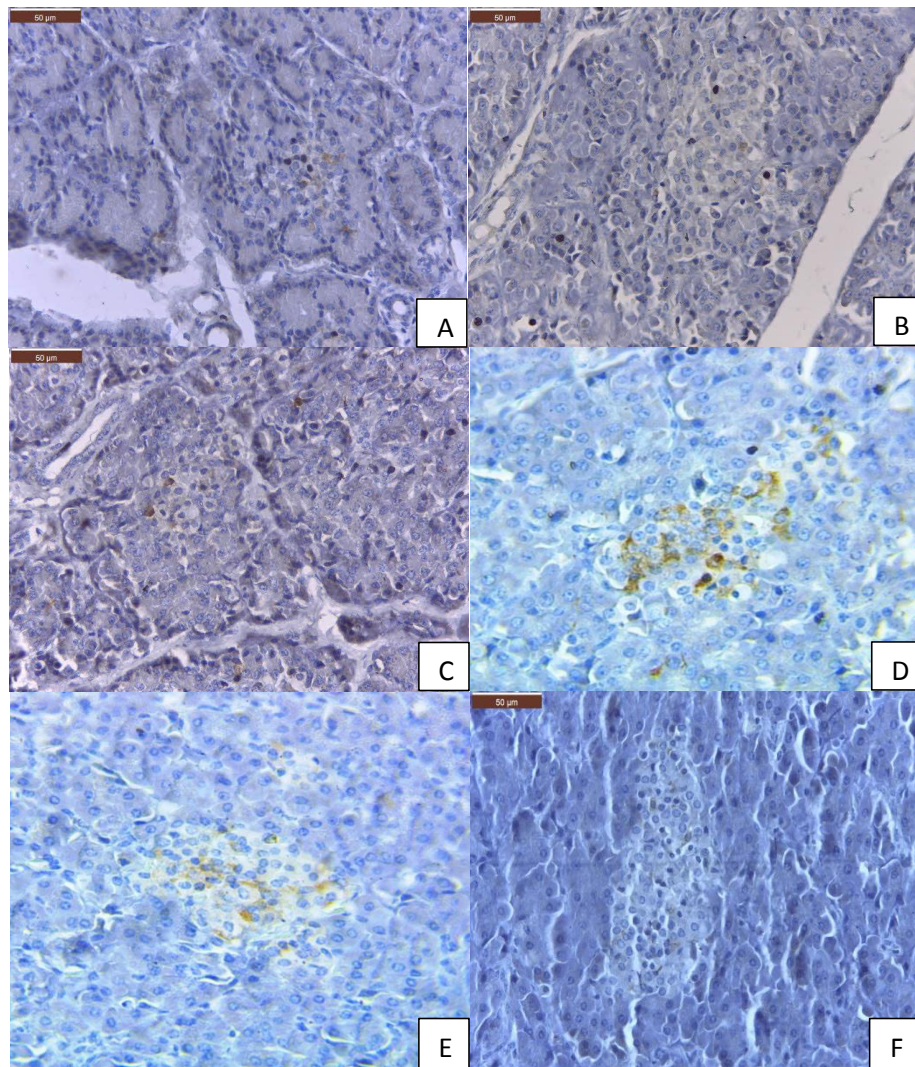
Figura 17. Células productoras de insulina en islotes pancreáticos de alpaca (IHQ, contraste H-E 400x **A-H**). **A.** Muchas células con marcación fuerte positiva a insulina dispersas en el lóbulo izquierdo del páncreas de feto de último tercio de gestación de alpaca. **B.** Islote con abundantes células positivas a insulina ubicadas aleatoriamente en el islote predominando a la periferia en el lóbulo derecho pancreático en alpaca recién nacida, se muestra también células aisladas positivas a insulina. **C.** Islote en lóbulo izquierdo pancreático de cría de alpaca de una semana de edad que evidencia células positivas a insulina en el centro del islote. **D.** Islote difuso en lóbulo izquierdo del páncreas de alpaca de dos semanas de edad que evidencia fuerte marcación positiva a insulina en el centro del islote y también distribución polar. **E.** Tres islotes pancreáticos en lóbulo izquierdo de alpaca de un mes de edad que evidencia células positivas a insulina en el centro del islote. **F.** Tres islotes pancreáticos en alpacas de 4 meses de edad que evidencian marcación positiva a insulina en distribución polar, central y aleatoria. **G.** Marcación media positiva para insulina en casi la totalidad del islote en lóbulo izquierdo pancreático en alpaca juvenil. **H.** Islote pancreático en el cuerpo del páncreas de alpaca adulta que evidencia

marcación fuerte positiva a insulina en casi todo el islote.

Células (δ): Somatostatina

La presencia de células delta, productoras de somatostatina, fue escasa. Se observó células delta en crías recién nacidas hasta juveniles. En estos animales se observó células con marcación positiva a somatostatina con una marcación grado 1 en todas las regiones del páncreas.

Se observó que existen células delta en una ubicación periférica dentro de los islotes endocrinos en estos animales, aunque también se observó células en posición central en animales entre 1 semana y 4 meses de edad. No se observó su presencia en fetos y alpacas adultas. (Figura 18).



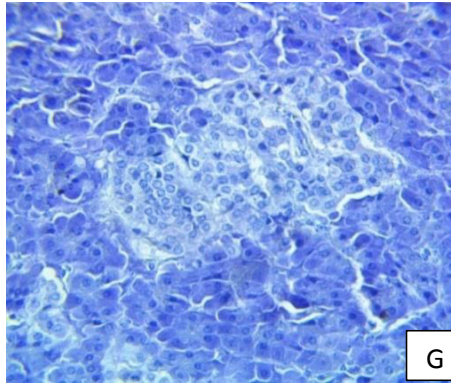


Figura 18. Células productoras de somatostatina en islotes pancreáticos de alpaca (IHQ, contraste H-E 400x **A-G**). **A.** Escasas células positivas a somatostatina en islote del lóbulo izquierdo del páncreas de alpaca recién nacida. **B.** Islote con escasas células positivas a somatostatina de marcación leve ubicadas en la periferia del islote en el cuerpo pancreático de alpaca de una semana de edad. **C.** Islote difuso en lóbulo izquierdo pancreático de cría de alpaca de dos semanas de edad que evidencia escasas células positivas a somatostatina en marcación leve hacia la periferia. **D.** Islote pancreático difuso con marcación positiva media a somatostatina en crías de alpaca de un mes de edad en lóbulo derecho, las células se dispersan aleatoriamente. **E.** Islote pancreático en lóbulo izquierdo de alpaca de cuatro meses de edad que evidencia células positivas a somatostatina con marcación media disperso aleatoriamente en el islote. **F.** Escasas células con marcación positiva a somatostatina en la periferia de islote pancreático en el cuerpo del páncreas de alpaca juvenil. **G.** Islote pancreático con marcación negativa a somatostatina en páncreas de alpaca evidenciado en fetos y adultos.

Células (γ): Polipéptido pancreático

Se observaron células productoras de polipéptido pancreático con poca uniformidad en la distribución y una gran variabilidad. Estas células se encontraban generalmente en forma individual o en grupos en la periferia del islote, en ocasiones formando una corona. Estuvieron presentes en mayor concentración en el cuerpo y lóbulo derecho de los animales estudiados, principalmente en las alpacas juveniles y adultas.

Al igual que en insulina, se encontró en fetos de último tercio de gestación una moderada cantidad de células positivas a polipéptido pancreático de manera dispersa cerca de los conductos, sin una formación visible de islote de Langerhans.

El grado de marcación a la presencia de células productoras de polipéptido pancreático observado fue 1 y 2. Pero también se pudo observar la presencia de los denominados “Islotes ricos en células PP” en el lóbulo derecho pancreático como se mencionan en otros estudios (Baskin, 2015). (Figura 19).

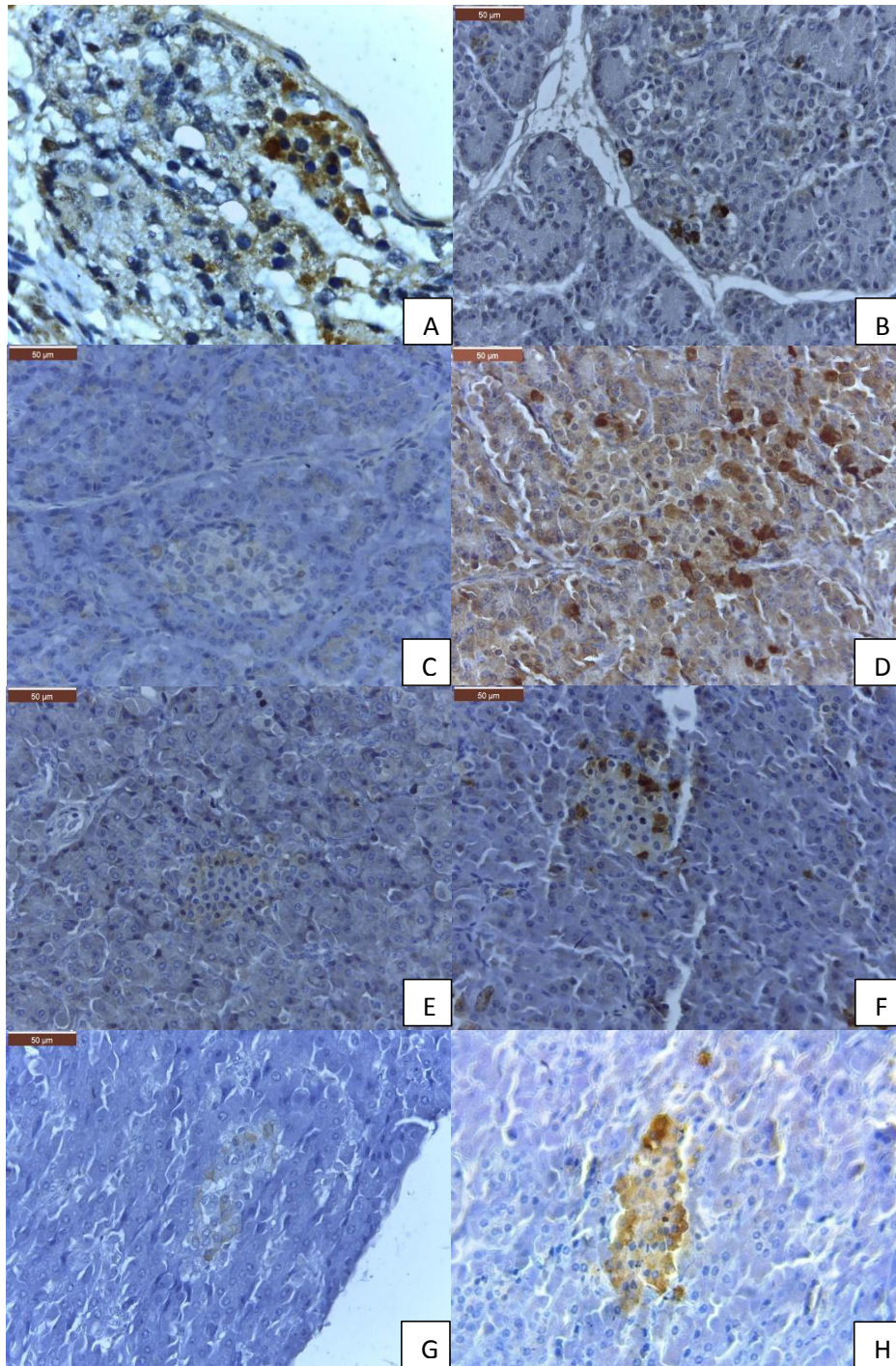


Figura 19. Células productoras de polipéptido pancreático en islotes pancreáticos de alpaca (IHQ, contraste H-E 1000x **A**, H-E 400x **B-H**). **A**. Células positivas a polipéptido pancreático distribuidas aleatoriamente en páncreas de feto de último tercio de gestación de alpaca. **B**. Islote con pocas células positivas a polipéptido pancreático ubicadas en la periferia del islote en el cuerpo pancreático en alpaca recién nacida. **C**. Islote en lóbulo izquierdo pancreático de cría de alpaca de una semana de edad que evidencia células con marcación leve positivas a polipéptido pancreático alrededor del islote. **D**. Dos islotes pancreáticos con marcación positiva a polipéptido pancreático en crías de alpaca de dos semanas de edad en lóbulo derecho, las células se dispersan hacia la periferia del islote. **E**. Islote pancreático en lóbulo izquierdo de alpaca de un mes de edad que evidencia células positivas a polipéptido pancreático en la periferia del islote con marcación leve. **F**. Islote pancreático con marcación positiva a polipéptido

pancreático en la periferia en alpacas de 4 meses de edad. **G.** Marcación leve positiva para polipéptido pancreático en casi la periferia del islote en lóbulo derecho pancreático en alpaca juvenil. **H.** “Islote rico en células PP” en lóbulo derecho del páncreas de alpaca adulta.

En nuestro estudio realizado en las diferentes edades de la alpaca usando la técnica de inmunohistoquímica, se evidenció la presencia de cuatro tipos celulares que son: células alfa productoras de glucagón, células beta productoras de insulina, células delta productoras de somatostatina y células PP productoras de polipéptido pancreático, los cuales presentaban una distribución variable, predominando la ubicación central de las células beta y periférica de las demás células, sin embargo en el recién nacido se pudo observar la presentación inversa de células beta (periférica) y alfa (central). En estudios realizados en camellos, la localización central de las células beta en los islotes de camellos es semejante en la mayoría de los animales domésticos. Sin embargo, el caballo parece ser la excepción porque las células beta están localizadas periféricamente en los islotes. En el páncreas del camello las células beta tienen un núcleo oval y están organizadas en cordones (Mustafa, 2007). Las células alfa en camellos son pocas en número comparadas con las células beta y están localizadas en la periferia de los islotes, pero también se pueden encontrar en localización central, su núcleo es generalmente ovoide aunque también hay núcleos esféricos (Mukherjee *et al.*, 1988). La localización periférica de las células alfa en los islotes en camellos es similar en los animales domésticos, aunque nuevamente el caballo parece ser la excepción ya que las células alfa están localizadas centralmente en los islotes (Mustafa, 2007).

Una particularidad encontrada en el páncreas de los fetos de último tercio de gestación trabajados fue la ausencia de la organización celular como islotes pancreáticos, pero si se observó la presencia de células endocrinas beta y PP en mayor cantidad que células alfa y en ausencia de células delta. Lo hallado se contradice con lo encontrado por Bocian-Sobkowska *et al.*, (1997) en estudios realizados en humanos donde menciona que, en el páncreas en desarrollo, las células que contienen glucagón y somatostatina son las más numerosas, mientras que la insulina y las células que contienen PP ocurren en cantidades menores. Las células endocrinas forman agregados de varios tamaños y aspectos microscópicos, y el tamaño del islote y el número de células β aumenta desde el nacimiento a la adultez (Meier *et al.*, 2008).

Estudios realizados en Egipto sobre la distribución celular, mediante inmunohistoquímica, demostraron que el páncreas endocrino del camello está conformado por células secretoras de hormonas dispuestas en islotes como sucede en otras especies, la diferenciación de éstos con respecto a la porción exocrina es más notoria en caballos. El tamaño de los islotes y su población celular varía significativamente en diferentes especies (Hafez *et al.*,

2015). La variación en los tamaños de los islotes ha sido notificada antes en varias especies (Elayat *et al.*, 1995; White *et al.*, 1999; Aizawa *et al.*, 2001; Heller, 2010); incluyendo el camello (Adeghate, 1997), el caballo (Furuoka *et al.*, 1989), y los bovinos (Hiratsuka *et al.*, 1996). Las razones exactas para estas variaciones son desconocidas, pero es probablemente debido a los cambios necesarios en respuesta a los estímulos metabólicos o como consecuencia del desarrollo embriológico (Adeghate, 1997).

Se investigó todas las disposiciones endocrinas asociadas con los conductos pancreáticos de ratas y se encontró que los elementos endocrinos se observaban a menudo como células endocrinas individuales (de todos los tipos) dentro del epitelio ductal o como brotes de células que sobresalían de la pared ductal hacia el tejido circundante. (Wieczorek *et al.*, 1998)

El islote pancreático mostró diversos patrones de disposición de células endocrinas. El islote típico con células β que secretan la insulina que forman el núcleo rodeado por otras células endocrinas en la periferia, se basa en gran medida en estudios de islotes normales de roedores. (Steiner *et al.*, 2010).

De acuerdo a lo encontrado en nuestro trabajo en alpacas concuerda con lo discutido por (Steiner *et al.*, 2010) sobre la sorprendente plasticidad de la arquitectura de los islotes y la composición celular entre varias especies, incluyendo los cambios en la respuesta a los estados metabólicos dentro de una sola especie. Esta plasticidad refleja la adaptación evolutiva adquirida inducida por condiciones fisiológicas alteradas, en lugar de disparidades inherentes entre las especies.

En el cuadro 3 se indica la presencia y el patrón de distribución de las células productoras de hormonas del páncreas endocrino según las edades de alpacas estudiadas.

Cuadro 3. Presencia y patrón de distribución celular del páncreas endocrino en alpaca.

CÉLULAS DEL PANCREAS ENDOCRINO				
EDADES ALPACA	Alfa- Glucagón	Beta- Insulina	Polipéptido pancreático	Delta- Somatostatina
Fetos último tercio	++ Células dispersas	+++ Células dispersas	++ Células dispersas	-----
Recién nacido	+++ Centrales	+++ Aleatoria	++ Periférica	++ Periférica
1 semana	+++ Aleatoria	++ Central	++ Periférica	++ Aleatoria
2 semanas	+++ Periférica	++ Central, Polar	++ Periférica	++ Aleatoria
1 mes	++ Periférica	+++ Central	++ Periférica	++ Aleatoria
4 meses	++ Periférica	++ Central	++ Periférica	++ Aleatoria
Juvenil	+++ Periférica*	+++ Aleatoria	++ Periférica	++ Periférica
Adulta	+++ Periférica	+++ Central	+++ Periférica**	-----

Ausencia (-), Presencia: escasas (+), moderadas (++), abundantes (+++)

*Presencia de islotes glucagón

**Presencia de islotes ricos en células PP

En el cuadro 4 (A y B) se cuantifica las áreas de marcación positiva por tipo celular del páncreas endocrino en los animales en estudio.

Cuadro 4A. Áreas de marcación positiva por tipo celular alfa y beta.

EDADES	CÉLULAS DEL PANCREAS ENDOCRINO					
	Alfa - Glucagón			Beta - Insulina		
	Área (μm^2) del islote	Área (μm^2) de tinción	% de tinción	Área (μm^2) del islote	Área (μm^2) de tinción	% de tinción
Recién nacido	7741.77	5033.37	64.38	6371.37	2026.61	34.25
	(6923.35 - 8344.92)	(3751.73 - 6267.05)	(54.19 - 75.10)	(2632.77 - 8538.2)	(723.2 - 2795.26)	(18.19 - 61.30)
1 semana	7202.64	2785.26	42.05	7560.52	2498.48	33.55
	(1741.95 - 18607.23)	(701.79 - 7779.91)	(11.32 - 64.86)	(5247.49 - 10721.50)	(1520.35 - 3636.47)	(22.06 - 56.73)
2 semanas	6741.69	3430.18	45.91	6567.64	2086.54	35.26
	(1588.14 - 16308.16)	(623.13 - 9663.02)	(17.69 - 66.38)	(2047.48 - 12947.74)	(683.90 - 3833.36)	(12.29 - 60.38)
1 mes	4774.47	2029.77	43.64	3597.17	1321.63	37.16
	(1290.78 - 13251.26)	(468.23 - 5521.18)	(22.33 - 69.09)	(1985.92 - 6703.08)	(345.36 - 3128.78)	(16.53 - 54.67)
4 meses	3874.77	1014.72	25.09	3211.27	1173.51	39.28
	(785.76 - 13002.24)	(34.94 - 2775.08)	(2.20 - 63.10)	(1646.88 - 4775.39)	(386.04 - 1959.56)	(19.58 - 61.05)
Juvenil	3866.19	1637.43	42.16	4489.67	2875.10	60.81
	(1716.86 - 5035.85)	(698.60 - 2928.61)	(30.32 - 65.72)	(1781.92 - 10720.64)	(635.57 - 8245.62)	(14.53 - 80.48)
Adulta	9219.32	2629.57	28.23	3288.54	1802.36	55.86
	(3288.68 - 16140.92)	(366.21 - 6432.25)	(11.14 - 49.57)	(1040.58 - 5592.07)	(715.32 - 3934.39)	(23.49 - 70.37)
Promedio (valor menor – valor mayor)						

Cuadro 4B. Áreas de marcación positiva por tipo celular PP y delta.

EDADES	CÉLULAS DEL PANCREAS ENDOCRINO					
	Polipéptido pancreático			Delta - Somatostatina		
	Área (μm^2) del islote	Área (μm^2) de tinción	% de tinción	Área (μm^2) del islote	Área (μm^2) de tinción	% de tinción
Recién nacido	4451.88	520.65	14.93	3019.19	89.15	2.98
	(2988.40 - 6406.71)	(156.56 - 835.62)	(2.44 - 27.96)	(1125.27 - 5233.20)	(29.11 - 186.61)	(1.86 - 4.60)
1 semana	6801.97	358.56	5.71	7135.34	233.85	2.79
	(3340.02 - 17157.79)	(103.25 - 509.56)	(1.29 - 13.76)	(3684.978 - 18666.95)	(37.74 - 1159.70)	(0.61 - 7.18)
2 semanas	3734.24	212.01	6.05	5976.09	62.41	0.99
	(2872.62 - 6042.83)	(61.27 - 323.73)	(1.93 - 11.04)	(2178.44 - 9639.73)	(16.90 - 99.25)	(0.78 - 1.16)
1 mes	4327.15	382.56	9.95	4285.36	78.39	2.30
	(1373.79 - 8180.55)	(214.22 - 690.56)	(4.84 - 18.19)	(1802.46 - 13129.58)	(14.73 - 194.61)	(0.69 - 8.43)
4 meses	4867.33	1651.44	32.67	3617.64	475.19	10.87
	(2317.78 - 8644.37)	(394.45 - 3135.62)	(11.46 - 51.53)	(1143.41 - 8131.52)	(27.66 - 1806.08)	(2.42 - 25.31)
Juvenil	9011.73	879.93	11.04	10146.37	199.10	2.16
	(2420.45 - 17684.05)	(186.80 - 2428.71)	(3.49 - 22.82)	(7770.09 - 12688.07)	(45.13 - 405.74)	(0.36 - 4.76)
Adulta	4318.16	1787.92	39.30	0	0	0
	(1119.55 - 8332.78)	(78.83 - 5255.35)	(1.84 - 86.28)	0	0	0
Promedio (valor menor – valor mayor)						

En nuestro estudio, el área en micras para cada una de las células endocrinas vario con la edad. Para las células alfa productoras de glucagón se evidenció un porcentaje de tinción del 64% para el grupo de recién nacidos, disminuyendo aproximadamente al 25% y 28% en crías de 4 meses y adultas, respectivamente; manteniéndose como las células de mayor presentación en el islote hasta la edad de un mes para luego pasar a ser el segundo grupo celular más numeroso. Para las células beta productoras de insulina, se evidenció que el porcentaje de tinción fue entre el 34% y 40% hasta los 4 meses de edad, siendo el segundo grupo celular del islote, para luego ser el grupo más representativo en juveniles y adultos entre el 55% y 60%, respectivamente. Para las células PP en este estudio, fue el tercer grupo celular llegando hasta aproximadamente el 40% en adultos debido a la presencia de islotes ricos en PP en el lóbulo derecho y cuerpo del páncreas, se evidenció células PP en todos los grupos estudiados. Para las células delta productoras de somatostatina, se evidenció que fue el último grupo celular del islote manteniéndose entre el 1% y 3%, sin embargo, con la particularidad, que en la edad de cuatro meses de la alpaca hubo un aumento en la presencia de estas llegando aproximadamente al 11% y no se evidencio su presencia en alpacas adultas.

Los cambios en la presencia de células beta y alfa en las distintas edades en la alpaca, estarían relacionados a los mecanismos de adaptación y necesidades metabólicas presentes en el páncreas de alpacas a distintas edades. Estos mecanismos que usa el páncreas están reportados en estudio realizados en ratas, ratones, perros y humanos. Mecanismos que usa el organismo para mantener la homeostasis de la glucemia (Barberá y Gasa, 2007).

Estudios en diferentes especies indican una variación en el número de células productoras de insulina y glucagón, así como la ubicación de estas células y la distribución de las mismas en las diferentes porciones del páncreas. En el perro, las células beta constituyen el 75% de la población celular de los islotes, en la oveja el 98%. Las células alfa normalmente suponen el 25% de la población de los islotes; en el cerdo pasan de un 50% en el momento del nacimiento a un 10 o 20% en el adulto; falta en los islotes del lóbulo derecho del perro (Climent *et al.*, 2005).

Las células alfa secretoras de glucagón, representan el segundo tipo celular más abundante, en torno al 20% en roedores, pudiendo llegar a alcanzar el 45% en humanos. Estos datos sugieren una mayor relevancia de este tipo celular en el islote humano (Elayat *et al.*, 1995; Wierup *et al.*, 2002).

En el estudio inmunohistoquímico realizado por Hafez *et al.*, (2015) en camellos,

equinos y bovinos, se reporta que a pesar de que las proporciones relativas de las diferentes células endocrinas del islote variaron de un animal a otro en todas las especies; las células beta fueron el tipo celular más abundante, seguido por las células alfa, delta y células PP en orden decreciente. En este estudio se menciona también que las células PP productoras de polipéptido pancreático fueron las menos numerosas en todas las especies, excepto en los bovinos donde fue el segundo tipo celular más numeroso después de las células beta como lo menciona Hiratsuka *et al.*, (1996) en su trabajo con bovinos.

Las células delta usualmente forman del 5 al 10% del volumen del islote (Bloom y Polak, 1987). La mayoría de las células delta están en la periferia de los islotes de los bovinos (Bonner-Wier and Like, 1980), el caballo (Furuoka *et al.*, 1989) y el camello (Al-Ani, 1987), pero en camellos la localización podría ser periférica o central (Sultan, 1999).

El glucagón es la hormona contrareguladora de la insulina, que junto a ésta se encarga del mantenimiento del equilibrio homeostático de la glucosa (Duning y Gerich, 2007). Aunque actúa sobre múltiples tejidos, su principal diana metabólica es el hígado, donde estimula la glucogenólisis y la gluconeogénesis, e inhibe a su vez la glucólisis y glucogenogénesis. De esta manera el glucagón favorece la movilización y producción hepática de glucosa, inhibiendo el almacenamiento de la misma. Además, existen estudios realizados en ratón que demuestran que el glucagón inhibe la síntesis y secreción de triglicéridos y favorece la lipólisis (Slavin *et al.*, 1994; Longuet *et al.*, 2008).

La célula β juega un papel central en la homeostasis de los nutrientes que llegan al organismo a través de la dieta, no solo por ser capaz de fabricar y secretar la insulina, sino además por hacer que dicha secreción sea en el momento justo y la cantidad adecuada. Para ello, la célula B es capaz a través de un sistema sensor de poder medir las concentraciones extracelulares de glucosa, el principal nutriente inductor del proceso secretor. En circunstancias en las que los nutrientes glucosa y ácidos grasos están elevados de forma crónica, éstos se convierten en sustancias tóxicas que con el tiempo pueden llegar a provocar la muerte de la propia célula beta. Dado que no existe ninguna hormona que pueda reemplazar funcionalmente a la insulina, aparece la diabetes tipo 2. Cuando esta se declara se observan ciertos puntos coincidentes con la diabetes tipo 1. Así, por ejemplo, en ambos casos la célula beta sufre una destrucción, aunque en el caso de diabetes tipo 1 es por causas autoinmunes (Roche, 2007).

El polipéptido pancreático tiene como función la regulación de la función gastrointestinal, mediante su influencia, tanto sobre la secreción pancreática exocrina, como

sobre el vaciamiento de la vesícula biliar (Brandan *et al.*, 2006). El polipéptido pancreático, que también se ha detectado como producido en el intestino delgado, el cerebro y en los ganglios del sistema autónomo; es considerado como una suerte de modulador del proceso de absorción intestinal, dando una curva de absorción durante el proceso digestivo más suave. Su secreción es estimulada cuando se produce abundante ingestión de proteínas, durante el ayuno, el ejercicio y la hipoglucemia aguda. La administración de glucosa intravenosa y la ya citada somatostatina inhiben su secreción. Se ha reconocido que también se encuentra bajo control colinérgico ya que su concentración en sangre cae después de la administración de atropina (Lis *et al.*, 2003).

La somatostatina, aislada primero del hipotálamo (Brazeau *et al.*, 1973), ejerce de modo paracrino una actividad inhibitoria en la secreción de las otras tres hormonas que produce el islote. La somatostatina tiene como principal efecto modular la absorción intestinal de sustratos, inhibiendo las funciones exocrinas y motoras del tracto gastrointestinal. Es posible que en forma indirecta regule la respuesta proporcional de insulina y glucagón de acuerdo a los requerimientos, oferta y disponibilidad de sustratos energéticos. Ello porque existe una compleja interregulación entre las tres hormonas, ejerciendo la somatostatina un efecto inhibitor sobre el glucagón y la insulina (Arteaga *et al.*, 1997). Como se pudo observar en el presente trabajo, existe una mayor presentación de células delta en ambos lóbulos, derecho e izquierdo, en animales de menor edad que en el cuerpo del páncreas. Esto puede deberse a que estos individuos se encuentran en pleno crecimiento, y por lo tanto con una mayor fluctuación hormonal de somatostatina y sus antagonistas. En el caso de animales juveniles y adultos se observó que las células delta, productoras de somatostatina, se encontraban con mínima presencia.

3. Descripción de la ultraestructura del páncreas endocrino de alpaca

Feto de último tercio de gestación

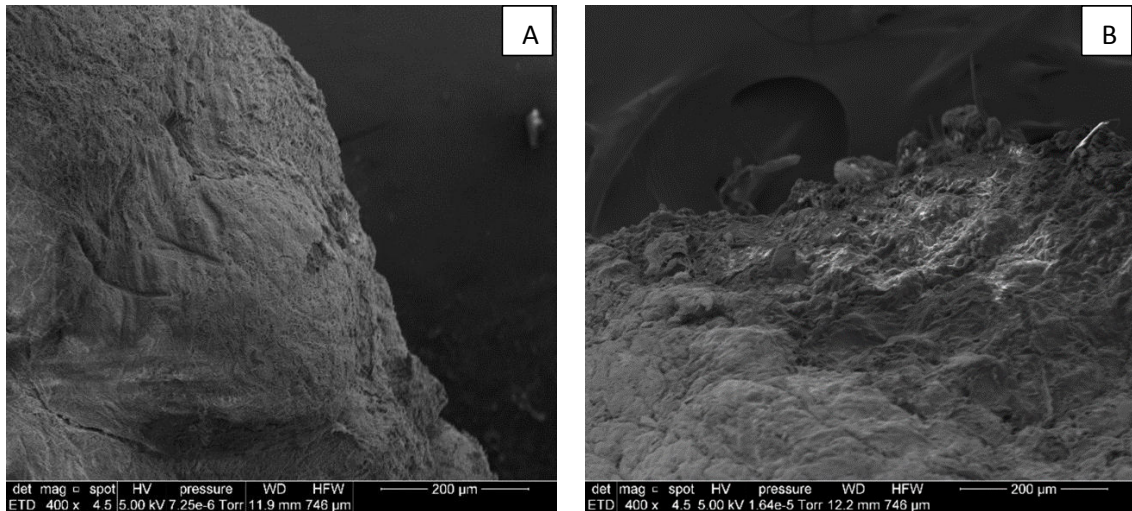


Figura 20. Descripción ultraestructural de páncreas en feto de último tercio de gestación de alpaca (SEM). **A.** En la microfotografía de la microscopia de barrido se observa en una superficie de tejido conectivo unas estructuras filamentosas que se entrecruzan como una malla densa en toda la superficie, siendo lisa en algunas zonas y en otras levemente irregulares. **B.** No se observa la sinuosidad demarcada de los acinos pancreáticos ni islotes, como en juveniles y adultos.

Cría 1 mes

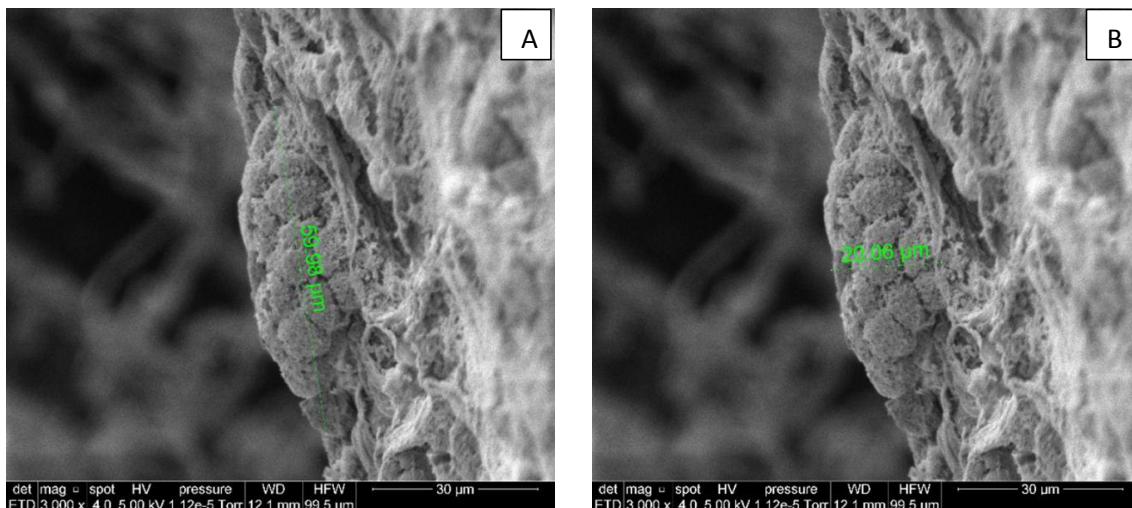


Figura 21. Descripción ultraestructural de páncreas en cría de alpaca de un mes de edad (SEM). **A-B.** En la microfotografía de la microscopia de barrido se observa en una parte de la sección de tejido, un islote de Langerhans como una estructura ovoide a elíptica de 59.98 micras de largo y 20.06 micras de ancho aproximadamente, que sobresale de la superficie y que está constituida por múltiples células que dan la apariencia de una mora y que están rodeadas por estructuras fibrilares a manera de malla de tejido conectivo.

Alpaca Juvenil

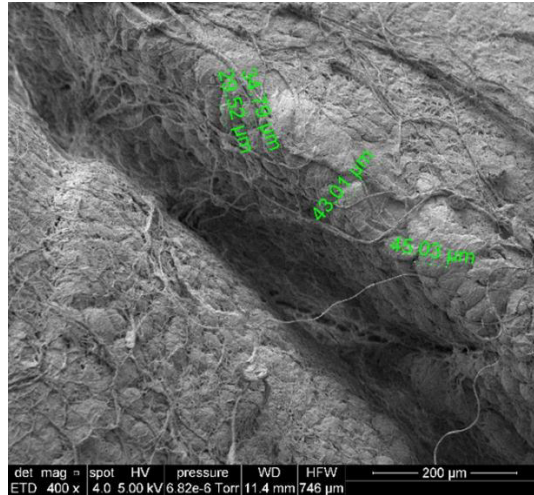


Figura 22. Descripción ultraestructural de páncreas en alpaca juvenil (SEM). En la microfotografía se observan 2 lóbulos separados por una trama de tejido conectivo que se visualiza a manera de hebras o fibras que se entrecruzan como mallas, las mismas que se disponen encima de un parénquima cuya citoarquitectura corresponde al tejido acinar del páncreas, observándose como múltiples elevaciones demarcadas por un fino tejido conectivo entre las mismas. Estas estructuras compatibles con acinos tienen medidas aproximadas que van desde 29.52 micras a 45.03 micras para los acinos medidos en esta microfotografía.

Alpaca Adulta

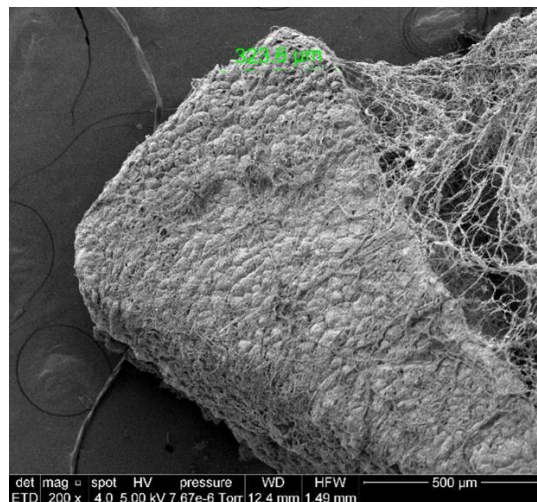


Figura 23. Descripción ultraestructural de páncreas en alpaca adulta (SEM). En la microfotografía se observa una superficie irregular con la evidencia de estructuras fibrilares que se disponen entrecruzadas como una malla laxa que permite visualizar estructuras acinares que sobresalen haciendo elevaciones ovoides o redondeadas y en otro campo se observa un área de células más pequeñas, redondeadas y ligeramente demarcadas por un conectivo que las rodea irregularmente y también se encuentran tapizadas por esta malla delgada de tejido conectivo.

En nuestro estudio también realizamos la descripción ultraestructural del páncreas de alpaca en fetos de último tercio de gestación, crías de un mes, juvenil y adulto utilizando la microscopia electrónica de barrido. Se observó que en los fetos no presenta la sinuosidad demarcada de los acinos pancreáticos ni islotes como lo ilustra Riopel *et al.*, (2014) en fetos humanos donde usando imágenes SEM demostraron una cantidad significativa de matriz extracelular y fibras, pequeñas células dispersas a las 9 semanas mientras que a las 14-20 semanas del feto humano hubo un aumento importante en el número de cúmulos de células epiteliales con una intercalación compleja de la matriz extracelular.

En crías, juveniles y adultos se observó al islote de Langerhans como una estructura ovoide a elíptica que sobresale de la superficie y que está constituida por múltiples células que dan la apariencia de una mora y que están rodeadas por estructuras fibrilares a manera de malla de tejido conectivo. Se observó lóbulos separados por una trama de tejido conectivo que se visualiza a manera de hebras o fibras que se entrecruzan como mallas, las mismas que se disponen encima de un parénquima cuya citoarquitectura correspondiente al tejido acinar del páncreas.

Nuestra descripción para páncreas de alpaca coincide con la de Bertelli *et al.*, (1994) que indica que una parte sustancial del páncreas endocrino en ratas se encuentra localizada cerca de los conductos excretores como pequeños grupos de células endocrinas y como islotes de Langerhans o asociados con los conductos como células endocrinas individuales dispersas a través del epitelio ductal. Además, detectó y describió una nueva estructura endocrina como brotes de células endocrinas (principalmente células beta) que sobresalían del epitelio ductal hacia el tejido circundante como una etapa de una "neo-histogénesis" pancreática endocrina que ocurre en el páncreas de rata adulta. Shindu *et al.*, (2015) en humanos, usando el microscopio electrónico de barrido observó que el tejido parenquimal normal del páncreas estaba compuesto por pequeños lóbulos separados por una fina capa de tejido conectivo. Los islotes de Langerhans fueron vistos como un grupo bien definido de células especializadas dispersas en el parénquima. Los conductos de drenaje fueron vistos alineados por el epitelio liso y múltiples aberturas de conductos laterales pequeños también se observaron en la pared del conducto.

VI. CONCLUSIONES

- En el estudio histológico del páncreas endocrino de la alpaca, no se evidencio la presencia de islotes de Langerhans definidos en los fetos de último tercio de gestación a diferencia de los demás grupos estudiados.
- En el estudio inmunohistoquímico del páncreas endocrino de la alpaca, la presencia de células alfa se dio en todas las edades, ubicándose principalmente en la periferia del islote, manteniéndose como las células de mayor presentación en el islote hasta la edad de un mes. Se observaron células beta en todas las edades, manteniendo una posición central, siendo el principal grupo celular en juveniles y adultos. Las células PP fue el tercer grupo celular en todas las edades estudiadas, su ubicación fue periférica y en adultos se observaron como particularidad los llamados “islotes ricos PP”. Las células delta fue el cuarto tipo celular, fueron pocas las células observadas ubicadas de manera aleatoria en el islote de las edades estudiadas excepto en fetos y adultos donde fueron ausentes.
- En el estudio de microscopia electrónica de barrido del páncreas endocrino de la alpaca, la presencia de islotes de Langerhans se dio en crías, juveniles y adultos, pero en fetos de último tercio de gestación no fue observado.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Adeghate E. 1997.** Immunohistochemical identification of pancreatic hormones, neuropeptides and cytoskeletal proteins in pancreas of the camel (*Camelus dromedarius*). J Morphol 231: 185-193. DOI: 10.1002/(SICI)1097-4687(199702)231:2<185::AID-JMOR7>3.0.CO;2-D
2. **Aizawa T, Kaneko T, Yamauchi K, Yajima H, Nishizawa T, Yada T, Matsukawa H, Nagai M, Yamada S, Sato Y, Komatsu M, Itoh N, Hidaka H, Kajimoto Y, Hashizume K. 2001.** Size-related and size-unrelated functional heterogeneity among pancreatic islets. Life Sci 69: 2627-2639. DOI: 10.1016/S0024-3205(01)01332-7
3. **AL-Ani MI. 1987.** Light microscopy of the camel (*Camelus dromedarius*) islets of langerhans. J Sugar Beet Research. 18: 75-80.
4. **Arteaga A, Maíz A, Olmos P, Velasco N. 1997.** Manual de diabetes y enfermedades metabólicas. Departamento de Nutrición, Diabetes y Metabolismo. Escuela de Medicina. Pontificia Universidad Católica de Chile.
5. **Barberá A, Gasa R. 2007.** Desarrollo embrionario del páncreas y regeneración en el páncreas adulto. En: El islote pancreático en el desarrollo y tratamiento de la diabetes. Editorial de la Sociedad Española de Diabetes. Madrid. p 125-137.
6. **Baskin DG. 2015.** A historical perspective on the identification of cell types in pancreatic islets of Langerhans by staining and histochemical techniques. J Histochem Cytochem 63: 543–558. DOI: 10.1369/0022155415589119
7. **Bertelli E, Regoli M, Bastianini A. 1994.** Endocrine tissue associated with the pancreatic ductal system: A light and electron microscopic study of the adult rat pancreas with special reference to a new endocrine arrangement. The Anat Rec 239: 371-378.
8. **Bloom SR, Polak JM. 1987.** Somatostatin. Br Med J. 295: 288-9. DOI: 10.1136/bmj.295.6593.288

9. **Bocian-Sobkowska J, Zabel M, Woźniak W, Surdyk-Zasada J. 1997.** Prenatal development of the human pancreatic islets. Immunocytochemical identification of insulin, glucagon, somatostatin and pancreatic polypeptide containing cells. *Folia Histochem Cytobiol.* 35: 151-4.
10. **Bonner-Wier S, Like AA. 1980.** A dual population of islets of langerhans in bovine pancreas. *Cell and Tissue Research.* 206:157-170. DOI: 10.1007/BF00233616
11. **Brandan N, Llanos IC, Miño CA, Ruiz D. 2006.** Hormonas Pancreáticas. Universidad Nacional del Nordeste, Facultad de Medicina - Catedra de Bioquímica. p 8-10.
12. **Brazeau P, Vale W, Burgus R, Ling N, Butcher M, Rivier J, Guillemin R. 1973.** Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science* 179: 77–79. DOI: 10.1126/science.179.4068.77
13. **Brissova M, Fowler MJ, Nicholson WE, Chu A, Hirshberg B, Harlan DM, Powers AC. 2005.** Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy. *J Histochem Cytochem* 53: 1087-97. DOI: 10.1369/jhc.5C6684.2005
14. **Cabrera O, Berman D, Kenyan N. 2006.** The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 2334-2339. DOI: 10.1073/pnas.0510790103
15. **Casanova F. 2016.** Caracterización morfológica del páncreas en alpacas (*Vicugna pacos*) en fetos de último tercio de gestación y neonatos. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 45 p.
16. **Cebra CK, Bildfell RJ, Fischer KA. 2006.** Microanatomic features of pancreatic islets and immunolocalization of glucose transporters in tissues of llamas and alpacas. *Am J Vet Res* 67: 524-528. DOI: 10.2460/ajvr.67.3.524
17. **Chuan He, Myers MA, Forbes BE, Grützner F. 2015.** Immunohistochemical analysis of pancreatic islets of platypus (*Ornithorhynchus anatinus*) and echidna (*Tachyglossus aculeatus ssp.*). *J Anat* 226: 373-380. DOI: 10.1111/joa.12279
18. **Climent S, Sarasa M, Muniesa P, Latorre R. 2005.** Manual de anatomía y embriología de los animales domésticos - Conceptos básicos y datos aplicativos. 1ª ed. Zaragoza: Acirbia SA. 433p.
19. **Dyce KM, Sack WO, Wensing CJG. 1987.** Textbook of Veterinary Anatomy. 1st ed. Philadelphia: W. B. Saunders. 820p.
20. **Elayat AA, El-Naggar MM, Tahir M. 1995.** An immunocytochemical and morphometric study of the rat pancreatic islets. *J Anat* 186: 629-637.
21. **[FAO] Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. 2005.** Situación Actual de los Camélidos Sudamericanos en el Perú. Proyecto de

- cooperación técnica en apoyo a la crianza y aprovechamiento de los camélidos sudamericanos en la región andina TCP/RLA/2914. Roma: FAO. Serie de Informes Técnicos. 62 p.
22. **Fowler ME. 1998.** Medicine and surgery of South American Camelids : llama, alpaca, vicuña, guanaco. 2nd ed. Iowa: Iowa State University Press. 549 p.
 23. **Furuoka H, Ito H, Hamada M, Suwa T, Satoh H, Itakura C. 1989.** Immunocytochemical component of endocrine cells in pancreatic islets of horses. *Nihon Juigaku Zasshi*. 51: 35-43.
 24. **Gazitua FJ, Corradini P, Ferrando G, Raggi LA, Parraguez VH. 2001.** Prediction of gestational age by ultrasonic fetometry in llamas (*Lama glama*) and alpacas (*Lama pacos*). *Anim Reprod Sci* 66: 81-92. DOI: 10.1016/S0378-4320(01)00083-5
 25. **Ghezzi MD, Alzola RH, Lupidio MC, Massone A, Castro AN, Rodríguez JA. 2000.** Conducto hepatopancreático de la Llama (*Lama glama*). *Rev Chi Anat* 18: 27-34. DOI: 10.4067/S0716-98682000000100004
 26. **Hafez SA, Zaghloul DM, Caceci T. 2015.** Immunohistochemical identification of the endocrine cells in the pancreatic islets of the camel, horse and cattle. *Eur J Anat* 19: 27-35.
 27. **Hall JE. 2016.** Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology. 13th ed. Philadelphia Elsevier. 1038 p
 28. **Hazelwood RL. 1989.** Embryology and anatomical organization of the vertebrate pancreas. In: *The endocrine pancreas*. Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall Inc, 9–15.
 29. **Heller RS. 2010.** The comparative anatomy of islets. *Adv Exp Med Biol* 654: 21-37. DOI: 10.1007/978-90-481-3271-3_2
 30. **Hiratsuka T, Abe M, Takehana K, Iwasa K, Hiraga T, Kobayashi A. 1996.** Immunohistochemical analysis of the endocrine cells in the pancreatic islets of cattle. *Okajimas Folia Anat Jpn* 72: 285-295. DOI: 10.2535/ofaj1936.72.6_285
 31. **Huaynates J. 2015.** Asociación entre el desarrollo del páncreas endocrino fetal y los niveles de glucosa séricos fetal y maternal en alpacas. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 55 p.
 32. **[INEI] Instituto nacional de estadística e informática. 2012.** Resultados Definitivos. IV Censo Nacional Agropecuario 2012. 2013: 18
 33. **Iñiguez LC, Alem R. 1996.** Role of camelids as means of transportation and exchange in the Andean region of Bolivia. *World Animal Review* 86: 12–21.
 34. **Junqueira L, Carneiro J. 2005.** Junqueira's Basic Histology Text and Atlas. 11th ed. McGraw-Hill Medical. 544p

35. **Kim SK, MacDonald RJ. 2002.** Signaling and transcriptional control of pancreatic organogenesis. *Current opinion in genetics & development*, 12 (5), 540-547.
36. **Klimstra D, Hruban R, Pitman M. 2007.** In: *Histology for Pathologists*, 3rd ed. Stacey E Mills, editor. Lippincott, Williams & Wilkins.
37. **Lis A, Barra F, Beltramino F, Peralta C, Rejf P. 2003.** Páncreas: diferencias microestructurales y de indicadores funcionales. *Sitio Argentino de Producción Animal*. Argentina.
38. **Longuet, C. 2008.** The glucagon receptor is required for the adaptive metabolic response to fasting. *Cell Metab.*, 8(5):359-71. 2008. DOI: 10.1016/j.cmet.2008.09.008.
39. **Málaga J. 1976.** Descripción Anatomohistológica del Páncreas de Alpaca. Tesis para optar el Título de Médico Veterinario - UNTA. Puno-Perú.
40. **Meier J, Butler A, Saisho Y, Monchamp T, Galasso R, Bhushan A, Rizza R, Butler P. 2008.** Beta cell replication is the primary mechanism subserving the postnatal expansion of beta cell mass in humans. *Diabetes* 57: 1584-94.
41. **Mukherjee, G., Singh, L. P., Barnwal, A. K. and Sharan, A. 1988.** Endocrine pancreas of sheep. *Indian Journal of Animal Sciences*. 58: 91-93.
42. **Mustafa GA. 2007.** A comparative morphological study on the pancreas of the dromedary (*Camelus dromedarius*) and the donkey (*Equus asinus*). [MVSc thesis]. Sudán: University of Khartoum. 160 p.
43. **Navarrete M, Sato A. 2010.** Aspectos Anatómicos de la cría de alpaca. En: *Sanidad de alpacas en la etapa neonatal. Manual para estudiantes y profesionales de veterinaria*. España: Complutense. p 51-62.
44. **Noguchi H. 2010.** Pancreatic stem/progenitor cells for the treatment of diabetes. *Rev Diabet Stud.*, 7(2): p. 105-11
45. **Panesi G. 2016.** Estudio Morfológico del páncreas en Alpacas (*Vicugna pacos*) Jóvenes y adultas. Tesis de Médico Veterinario. Lima. Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 29 p.
46. **Paredes MM. 2012.** Caracterización fenotípica y molecular de poblaciones de alpacas (*Vicugna pacos*) de las comunidades alto andinas y aplicación al programa de mejora de la calidad de la fibra. [Tesis Doctoral] Córdoba: Universidad de Córdoba. 159 p.
47. **Pérez W. 2016.** Anatomía del aparato digestivo del venado de campo (*Ozotoceros bezoarticus*). [Tesis Doctoral]. Montevideo. Universidad de la Republica. 68 p.
48. **Pezo D. 2010.** Geografía de la producción de alpacas por pequeños productores en Perú. En: *Cid, M. Sanidad de alpacas en la etapa neonatal*. 1ª ed. Madrid: Editorial Complutense. 148 p.

49. **Riopel M, Li J, Fellows GF, Goodyer CG, Wang R. 2014.** Ultrastructural and immunohistochemical analysis of the 8-20 week human fetal pancreas, *Islets*, 6: 4, e982949, DOI: 10.4161/19382014.2014.982949
50. **Roche M. 2007.** Glucolipotoxicidad en la Célula Beta y su relación con la Diabetes Tipo 2. En: *El Islote Pancreático en el Desarrollo y Tratamiento de la Diabetes*. Sociedad Española de Diabetes, 5 (3). p. 50-65.
51. **Sindhu RS, Subhash R, Gireesan P, Raji L, Natesh B, Rajan R, Kuruvilla AP. 2015.** Scanning electron microscopic analysis of pancreatic tissue in alcoholic and tropical chronic pancreatitis. *Pancreatolgy*. 15(3):226-32. doi: 10.1016/j.pan.2015.04.002.
52. **Slavin BG, Ong JM, Kern PA. 1994.** Hormonal regulation of hormonesensitive lipase activity and mRNA levels in isolated rat adipocytes. *J Lipid Res* 35, 1535-41.
53. **Steiner DJ, Kim A, Miller K, Hara M. 2010.** Pancreatic islet plasticity: Interspecies comparison of islet architecture and composition, *Islets*, 2:3, 135-145, DOI: 10.4161/isl.2.3.11815.
54. **Sultan HS. 1999.** Some morphological studies on the pancreas of the camel (*Camelus dromedarius*). M. Sc. Thesis, University of Khartoum.
55. **Vázquez G, Echevarría O. 2000.** Introducción a la microscopía electrónica aplicada a las ciencias biológicas. UNAM, FCE, México.
56. **Wang X, Zielinski MC, Misawa R, Wen P, Wang TY, Wang CZ, Witkowski P, Hara M, 2013.** Quantitative Analysis of Pancreatic Polypeptide Cell Distribution in the Human Pancreas. *PLoS ONE* 8(1): e55501. doi: 10.1371/journal.pone.0055501
57. **White SA, Hughes DP, Contractor HH, London NJ. 1999.** A comparison of cross sectional surface area densities between adult and juvenile porcine islets of Langerhans. *Horm Metab Res*, 31: 519-524. DOI: 10.1055/s-2007-978787
58. **Wieczorek G, Pospischil A, Perentes E. 1998.** A comparative immunohistochemical study of pancreatic islets in laboratory animals (rats, dogs, minipigs, nonhuman primates). *Exp Toxic Pathol* 50: 151-172
59. **Wierup N, Svensson H, Mulder H, Sundler F. 2002.** The ghrelin cell: a novel developmentally regulated islet cell in the human pancreas. *Regul Pept*, 107(1-3): p. 63-9.
60. **Xu RJ, Wang T, Zhang SH. 1999.** Functional structure and growth of the pancreas in postnatal growing animals: a review. *Developments in Animal and Veterinary Sciences* (Netherlands).
61. **Young B, O'Dowd G, Woodford P. 2013.** Wheater's Functional Histology: A Text and Colour Atlas. 6th ed. Philadelphia. Churchill Livingstone Elsevier. 464p.

62. **Zanuzzi C. 2010.** Efectos de la intoxicación con *Solanum glaucophyllum* (duraznillo blanco) sobre la proliferación, diferenciación y muerte celular en el intestino de conejos. Tesis de Doctorado. Argentina: Univ Nacional de La Plata. 286 p.

VIII. ANEXOS

ANEXO 1. PROTOCOLO INMUNOHISTOQUIMICA ABC

DESPARAFINADO

1. Neo Clear 1: 10 minutos
2. Neo Clear 2: 10 minutos

HIDRATACION

3. Etanol 100% 1: 10 minutos
4. Etanol 100% 2: 10 minutos

BLOQUEO DE LA PEROXIDASA ENDOGENA

5. Metanol (200ml+ 4ml de agua oxigenada): 30 minutos

CONTINUACIÓN DE HIDRATACIÓN

6. Alcohol 96° 1: 5 minutos
7. Alcohol 96° 2: 5 minutos
8. Alcohol 70°: 5 minutos
9. Alcohol 50°: 5 minutos

LAVADO:

10. Lavado en PBS: 5 minutos
11. Lavado en PBS: 5 minutos
12. Lavado en PBS: 5 minutos

RECUPERACION ANTIGENICA:

13. Buffer citrato (estandarizar a pH 6 con HCl) en horno microondas a 750 watts: 10 minutos
14. Dejar enfriar

LAVADO:

15. Lavado en PBS: 5 minutos
16. Lavado en PBS: 5 minutos
17. Lavado en PBS: 5 minutos

INACTIVACION DE UNIONES INESPECIFICAS:

18. Aplicar BSA 1% en cámara húmeda a temperatura ambiente: 30 minutos

ANTICUERPO PRIMARIO:

19. Aplicar en toda la muestra en cámara húmeda y dejar reposar hasta el día siguiente en refrigeración.

LAVADO:

20. Lavado en PBS: 5 minutos

21. Lavado en PBS: 5 minutos

22. Lavado en PBS: 5 minutos

ANTICUERPO SECUNDARIO (según el kit para monoclonal o policlonal)

23. Aplicar en cámara húmeda y dejar reposar por 30 minutos a temperatura ambiente.

LAVADO:

24. Lavado en PBS: 5 minutos

25. Lavado en PBS: 5 minutos

26. Lavado en PBS: 5 minutos

ENZIMA AB (según el kit para monoclonal o policlonal):

27. Aplicar en cámara húmeda y dejar reposar por 30 minutos a temperatura ambiente.

LAVADO:

28. Lavado en PBS: 5 minutos

29. Lavado en PBS: 5 minutos

30. Lavado en PBS: 5 minutos

REVELADO:

31. Aplicar DAB... hasta observar marcación y apuntar el tiempo que demoró en marcar... cortar la reacción con agua corriente.

ENJUAGUE:

32. Lavado en agua corriente: 5 minutos

33. Lavado en agua destilada: 5 minutos

COLORACIÓN DE CONTRASTE:

34. Hematoxilina de Harris: 5 segundos y enjuagar en agua corriente para eliminar el excedente de colorante.

FIJACIÓN DEL COLORANTE:

35. Agua corriente: 5 minutos

ENJUAGUE:

36. Agua destilada: 5 minutos

DESHIDRATACIÓN:

37. Alcohol 50°: 5 minutos

38. Alcohol 70°: 5 minutos

39. Alcohol 96° 1: 5 minutos

40. Alcohol 96° 2: 5 minutos

41. Etanol 100% 1: 5 minutos

42. Etanol 100% 2: 5 minutos

43. Neo Clear 1: 5 minutos

44. Neo Clear 2: 5 minutos

MONTAJE:

45. Bálsamo de Canadá: 10 segundos. Limpieza de la lámina después de 48 horas con Neo Clear para retirar restos de pegamento.

ANEXO 2. PROTOCOLO DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

Conservación de muestras para microscopía electrónica.

1. Pasaje de muestras en solución fijadora de Karnovsky por 2 horas.
2. Lavado de muestras con PBS para retirar exceso de solución fijadora.
3. Pasaje en alcohol de 50% por 15 minutos.
4. Pasaje en alcohol de 70% por 15 minutos.
5. Pasaje en alcohol de 96% por 15 minutos.
6. Pasaje en alcohol de 96% por 15 minutos.
7. Pasaje en alcohol de 100% (etanol) por 15 minutos.
8. Pasaje en alcohol de 100% (etanol) por 15 minutos
9. Dejar en refrigeración para llevar a laboratorio de equipamiento especializado en la Facultad de Biología de la Universidad Nacional Mayor De San Marcos.

Procesamiento de muestras para microscopía electrónica de barrido.

10. Desecado al punto crítico. Como alternativa, se puede lavar 2x en hexamethyldisilazane 10 min y dejar secar.
11. Colocar las muestras sobre soportes de microscopio electrónico de barrido utilizando cemento conductor.
12. Recubrimiento metálico con oro en atmósfera de Argon.
13. Visualizar y fotografiar en un microscopio electrónico de barrido en el laboratorio de equipamiento especializado en la Facultad de Biología de la Universidad Nacional Mayor De San Marcos

ANEXO 3. EDAD Y PESO DE ANIMALES

Código	Sexo	Edad	Peso (Kg)
G4-1	Hembra	Feto	9
G4-2	Macho	Feto	7
G4-3	Hembra	Feto	6.5
G4-4	Macho	Feto	7
G4-5	Hembra	Feto	6.5
G5-1	Hembra	RN	8
G5-2	Hembra	RN	7
G5-3	Hembra	RN	6
G5-4	Macho	RN	9
G5-5	Macho	RN	9
G6-1	Hembra	1 semana	7
G6-2	Macho	1 semana	5
G6-3	Hembra	1 semana	11
G6-4	Macho	1 semana	9
G6-5	Hembra	1 semana	10
G7-1	Macho	2 semanas	7
G7-2	Hembra	2 semanas	8
G7-3	Hembra	2 semanas	6
G7-4	Macho	2 semanas	7
G7-5	Hembra	2 semanas	8
G8-1	Macho	1 mes	6.5
G8-2	Hembra	1 mes	9
G8-3	Hembra	1 mes	11
G8-4	Macho	1 mes	11
G8-5	Hembra	1 mes	8
G9-1	Hembra	4 meses	20
G9-2	Hembra	4 meses	24
G9-3	Hembra	4 meses	9.5
G9-4	Hembra	4 meses	10
G9-5	Macho	4 meses	15
G2-1	Macho	1 año	40
G2-2	Macho	1 año	49
G2-3	Macho	1 año	42
G2-4	Macho	1 año	40
G2-5	Macho	1 año	
G3-1	Macho	2 años	44
G3-2	Macho	2 años	48
G3-3	Hembra	6 años	55

G3-4	Hembra	4 años	70
G3-5	Hembra	3 años	61